



Universidade Federal de Campina Grande - UFCG
Centro de Ciências e Tecnologia – CCT
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-
SÓLIDA UTILIZANDO RESÍDUO DO MARACUJÁ COMO
SUBSTRATO**

ROSANE LIÉGE ALVES DE SOUZA

Campina Grande

MAIO, 2008

PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO RESÍDUO DO MARACUJÁ COMO SUBSTRATO

ROSANE LIÉGE ALVES DE SOUZA

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Área de Concentração: Operações e Processos

Orientadora: Prof.^a Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

Campina Grande

MAIO, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S729p

2008 Souza, Rosane Liége Alves de

Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato / Rosane Liége Alves de Souza.— Campina Grande, 2008.

97f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Referências.

Orientadora: Profª Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

1. Fermentação semi-sólida. 2. Pectinases. I. Título.

CDU – 547.458.88(043)

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
UTILIZANDO RESÍDUO DO MARACUJÁ COMO SUBSTRATO**

Dissertação aprovada em 07 / 05 / 2008 com Distinção

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora – (CCT/UFCG)



Prof^ª Dra. Iracema de Oliveira Moraes
Examinadora Externa (FTPTAT)



Prof^ª Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo
Examinadora Externa (CTRN/UFCG)



Prof^ª Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador Externo – (CCT/UFCG)

MAIO, 2008

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela força e coragem para conseguir realizar este trabalho;

Agradeço à minha mãe Salete pelo amor e dedicação oferecido durante toda a minha vida;

Aos meus irmãos pelo incentivo e apoio nos momentos de cansaço;

À minha orientadora Líbia de Sousa Conrado Oliveira pela paciente orientação, amizade e apoio durante a realização deste trabalho;

À todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química, em especial à Sharline Florentino de Melo Santos, pela amizade, pelos conhecimentos trocados e a constante colaboração dispensada;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Às professoras Dra. Iracema de Oliveira Moraes, Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo e ao professor Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva como examinadores contribuindo para o melhoramento deste.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.1.1 Objetivos específicos	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 MARACUJÁ.....	3
2.1.1 Generalidades e características do maracujá.....	3
2.2 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS.....	4
2.2.1 Protopectina	4
2.2.2 Ácido péctico.....	4
2.2.3 Ácido pectínico.....	4
2.2.4 Pectina	5
2.3 ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	6
2.3.1 Classificação das pectinases.....	7
2.3.1.1 Pectinaesterases	7
2.3.1.2 Protopectinases:	7
2.3.1.3 Despolimerases:.....	7
2.3.2 Aplicação industrial das enzimas pectinolíticas.....	9
2.3.2.1 Indústrias de sucos de frutas	10
2.3.2.2 Indústria de vinhos.....	11
2.3.2.3 Extração de óleos.....	11
2.3.2.4 Indústria têxtil.....	12
2.4 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA NA PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	12
2.4.1 Microrganismo	13
2.4.2 Substrato.....	14
2.4.3 Tamanho da partícula.....	15
2.4.4 Temperatura	16
2.4.5 pH.....	16
2.4.6 Aeração	17

2.4.7 Umidade e atividade de água	17
2.4.7.1 Isotermas de sorção.....	19
2.5 TRABALHOS DESENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	20
2.6 ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTABILIDADE DAS ENZIMAS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	25
3.1 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO.....	25
3.2 CARACTERIZAÇÃO	25
3.2.1 Avaliação do percentual de casca e albedo dos frutos do maracujá.....	25
3.2.2 Caracterização do resíduo seco	25
3.2.2.1 Granulometria.....	26
3.2.2.2 Densidade aparente.....	26
3.2.2.3 Densidade real	26
3.2.2.4 Porosidade	27
3.2.2.5 pH	27
3.2.2.6 Cinzas	27
3.2.2.7 Umidade	28
3.2.2.8 °Brix.....	28
3.2.2.9 Açúcares redutores totais (ART) e Açúcares redutores (AR)	28
3.2.2.10 Pectina	29
3.2.2.11 Proteína total.....	29
3.3 ATIVIDADE DE ÁGUA.....	29
3.3.1 Restabelecimento da umidade no meio.....	31
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
3.5 MICRORGANISMO E INÓCULO	32
3.6 PROCESSO FERMENTATIVO.....	33
3.7 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	33
3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
3.8.1 Atividade pectinolítica	34
3.8.2 Atividade poligalacturonásica.....	35
3.9 ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTABILIDADE FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE PH DA ENZIMA POLIGALACTURONASE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO	38
4.1.1 Avaliação do percentual da casca e albedo dos frutos do maracujá para obtenção do resíduo.....	38

4.1.2	Caracterização do resíduo seco do maracujá	39
4.1.3	Atividade de água.....	42
4.1.3.1	Modelagem das isothermas de adsorção de umidade.....	42
4.1.3.2	Restabelecimento da umidade no meio para posterior fermentação	45
4.2	PROCESSO FERMENTATIVO	47
4.3	ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	56
4.3.1	Avaliação das respostas utilizando os dados da cinética fermentativa	56
4.3.1.1	Atividade pectinolítica (AP)	57
4.3.1.1	Atividade de poligacturonase (APG)	59
4.3.2	Avaliação das respostas utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado	63
4.3.2.1	Avaliação da resposta AP utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado.....	64
4.3.2.2	Avaliação da resposta APG utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado	65
4.4	RENDIMENTO DO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DA ATIVIDADE DE PG MÁXIMA DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO	67
4.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E ESTABILIDADE FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE PH DA POLIGALACTURONASE PRODUZIDA	68
5.	CONCLUSÕES	70
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	APÊNDICES.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Percentual de pectina em alguns resíduos de frutas	6
Tabela 2.2 – Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e de vinhos	10
Tabela 2.3 – Quantidade mínima de atividade de água necessária a sobrevivência de fungos	18
Tabela 2.4 – Modelos matemáticos para o ajuste de isotermas.....	19
Tabela 2.5 – Resumo de trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas pectinolíticas em meio FSS, utilizando diversos substratos e microrganismos	22
Tabela 3.1 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2 ² com três repetições no ponto central	32
Tabela 4.1 – Percentual de polpa, casca e albedo (<i>in natura</i> e seco) do maracujá.....	38
Tabela 4.2 – Valores médios e desvios padrão dos parâmetros físico-químicos do resíduo do maracujá em base seca.....	39
Tabela 4.3 – Valores experimentais da umidade de equilíbrio (XE) em função da atividade de água (a_w), nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C	43
Tabela 4.4 – Parâmetros de ajuste do modelo de GAB, coeficientes de determinação (R^2) e os desvios percentuais médios (P), para as temperaturas estudadas.....	44
Tabela 4.5 – Atividade de água encontrada pelo ajuste do modelo de GAB para as umidades de 50 e 60%.....	45
Tabela 4.6 – Dados da atividade pectinolítica para cada ensaio e por tempo de fermentação	56
Tabela 4.7 – Dados da atividade de PG para cada ensaio e por tempo de fermentação.	57
Tabela 4.8 – Modelos empíricos decodificados para atividade pectinolítica (AP) nos diferentes tempos de fermentação analisados a 95% de confiança	57
Tabela 4.9 – Análise de variância para atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação a 95% de confiança	58
Tabela 4.10 – Modelos empíricos decodificados considerando o efeito de curvatura para atividade de PG nos diferentes tempos de fermentação analisados a 95% de confiança	60
Tabela 4.11 – Análise de variância para atividade de PG em 44 horas de fermentação a 95% de confiança	60

Tabela 4.12 – Análise de variância para atividade de PG em 66 horas de fermentação a 95% de confiança	61
Tabela 4.13 – Dados de maior atividade de pectinases para cada experimento durante a cinética fermentativa do processo semi-sólido.....	63
Tabela 4.14 – Dados de maior atividade de poligalacturonase para cada experimento durante a cinética fermentativa do processo semi-sólido	63
Tabela 4.15 – Modelo empírico decodificado considerando o efeito da curvatura para atividade pectinolítica analisado ao nível de 90% de confiança	64
Tabela 4.16 – Análise de variância para atividade pectinolítica	64
Tabela 4.17 – Modelo empírico decodificado considerando o efeito da curvatura para atividade de PG.....	66
Tabela 4.18 – Análise de variância para atividade de PG	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fragmento de uma molécula de pectina.....	5
Figura 2.2 – Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina.....	9
Figura 4.1 – Aspecto visual do resíduo seco do maracujá.....	39
Figura 4.2 – Distribuição granulométrica do resíduo seco do maracujá	42
Figura 4.3 – Ajuste das isotermas de adsorção de umidade do resíduo seco do maracujá pelo modelo de GAB, nas temperaturas estudadas.....	43
Figura 4.4 – Relação entre a umidade (b.u.) e o volume de água adicionado (mL), para a temperatura de 30 °C	46
Figura 4.5 – Relação entre a atividade de água e o volume de água adicionado (mL), para a temperatura de 30 °C.....	46
Figura 4.6 – Processo semi-sólido em 44 de horas de fermentação para as condições dos ensaios 3 (a), 5 (b) e 2 (c).....	47
Figura 4.7 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 1 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	48
Figura 4.8 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 2 (■ Umidade (%),.....	50
AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	50
Figura 4.9 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 3 (■ Umidade (%),.....	51
AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	51
Figura 4.10 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 4 (■ Umidade (%),	52
AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	52
Figura 4.11 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 5 (■ Umidade (%),	54
AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	54
Figura 4.12 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo - Ensaio 6 (■ Umidade (%),.....	54
AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g)).....	54

Figura 4.13 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por <i>Aspergillus niger</i> do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 7 (■ Umidade (%), 55 AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))..... 55	55
Figura 4.14 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação..... 59	59
Figura 4.15 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação..... 62	62
Figura 4.16 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade de PG em 66 horas de fermentação..... 62	62
Figura 4.17 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica..... 65	65
Figura 4.18 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na produção de PG 67	67
Figura 4.19 – Estabilidade da poligalacturonase produzida por FSS frente às variações de temperatura 68	68
Figura 4.20 – Estabilidade da poligalacturonase produzida por FSS diante às variações de pH 69	69

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir enzimas pectinolíticas, utilizando como substrato o resíduo do maracujá (casca e albedo) e como agente da fermentação um fungo filamentososo da linhagem *Aspergillus niger* mutante CCT 0916. Dentre as diversas variáveis que influenciam neste processo, estudou-se a umidade inicial do meio e a suplementação com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) por meio de um planejamento fatorial 2^2 . Através da caracterização do resíduo, constatou-se que este contém níveis de pectina e açúcar propícios à produção das enzimas. O levantamento das isotermas a 25, 30, 35 e 40 °C forneceu os valores de umidade entre 5,90 e 9,80% b.s. considerada como a faixa para uma armazenagem segura e as atividades de água 0,92 – 1,00 como o intervalo no qual o microrganismo pode se desenvolver. O modelo de GAB se ajustou adequadamente às isotermas, nas temperaturas estudadas. De acordo com a classificação de BET, as curvas foram do tipo III, e conforme Blahovec classificaram-se como sendo do tipo II. Com relação à atividade enzimática, os melhores resultados foram obtidos com 40% de umidade e 1,0% de nitrogênio, atingindo 250 U/g de meio fermentado para a atividade pectinolítica e 20,9 U/g para atividade poligalacturonásica, em 44 e 66 horas de fermentação, respectivamente. A poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto, apresentou boa estabilidade térmica até temperaturas de 50°C. Quanto ao estudo de estabilidade diante às variações de pH, esta enzima manteve-se estável na faixa de pH entre 3,5 e 5,5 e não foi mais detectada para valores de pH acima de 6,5.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*, pectinase, *Aspergillus niger*, fermentação semi-sólida

ABSTRACT

This research was developed with the objective of producing pectic enzymes using as substrate the residue of passion fruit and as fermentation agent a filamentous fungus of the *Aspergillus niger* strain mutant CCT 0916. Among the variables which influenced this process, the initial content moisture and the supplementation with a source of nitrogen (ammonium sulfate) was studied by means of a 2² factorial design. Through the characterization of the residue, it was confirmed that it contains levels of pectin and sugar propitious to the production of the enzymes. The production of the isotherms to 25, 30, 35 and 40 °C furnished the values of moisture between 5.90 e 9.80% d.b. considered a range for a safe storage and water activities of 0.92 – 1.00 as the interval in which the microorganism can develop. The GAB model fitted adequately to the isotherms at the temperatures studied. According to BET classification, the curves were of type III, and according to Blahovec they were classified as type II. In relation enzymatic activity, the best results were obtained with 40% moisture and 1.0% nitrogen, reaching 250 U/g of fermented medium for pectin activity and 20.9 U/g for polygalacturonic activity, in 44 and 66 hours of fermentation respectively. The polygalacturonase produced in the raw enzymatic extract presented good thermal stability up to temperatures of 50°C. As for the study of stability according to pH variations, this enzyme remained stable in the pH range between 3.5 and 5.5 and was not detected anymore for pH values above 6.5.

Key words: *Passiflora edulis*, pectinase, *Aspergillus niger*, solid-state fermentation

1. Introdução e Objetivos

As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e bebidas, têxtil e papel. O mercado mundial de enzimas é atendido por um número relativamente pequeno de empresas. Da produção mundial de enzimas industriais, 60% pertencem à Europa, e o restante aos Estados Unidos e Japão (BHAT, 2000).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas células vegetais (MARTIN et al., 2007). São produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras. As pectinases correspondem a 25% do valor global de enzimas alimentícias comercializadas (JAYANI et al., 2005). A principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração (MARTIN, 2006). Este processo é empregado para sucos de maçã, pêra e uva. A aplicação das pectinases resulta em uma rápida queda de viscosidade e redução da turbidez. Partículas suspensas agregam-se e sedimentam-se. É possível, então, obter um suco límpido por filtração ou centrifugação (CASTILHO, 1997).

Destaque especial deve ser feita à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes nestes processos. Especialmente no Brasil, devido as suas características climáticas, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada nos cultivos microbianos para a produção de enzimas. Além disto, há uma grande variedade e disponibilidade de recursos naturais renováveis, que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial (PALMA, 2003).

A produção brasileira de maracujá supera a de manga, goiaba e mamão papaia, sendo o Brasil o maior exportador mundial de suco de maracujá (SILVA & MERCADANTE, 2002). Essa produção corresponde à cerca de 90% da produção mundial. As regiões Norte e Nordeste respondem por mais de 70% da produção nacional (EMBRAPA, 2004). A cultura do maracujá tem desempenhado uma importante função social nas regiões onde é explorada, garantindo um nível de emprego no campo e na indústria. No entanto, a maior parte do fruto (casca e albedo) é desperdiçada. Uma aplicação potencial seria como fonte de carbono para produção de

enzimas, representando uma solução para os problemas causados pela inadequada disposição final destes resíduos, uma vez que, essa disposição pode acarretar a produção de insetos, vetores causadores de doenças, bem como, odores desagradáveis no ambiente, geralmente, o próprio pátio da indústria que processa a matéria prima.

1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de pectinases usando como substrato o resíduo da agroindústria do maracujá (casca e albedo) e como agente da fermentação o microrganismo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliação do percentual de casca e albedo dos frutos do maracujá;
- caracterização do resíduo seco (casca e albedo) do maracujá;
- levantamento das isoterms de adsorção de umidade do resíduo seco nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C;
- fermentação do resíduo seco do maracujá (casca e albedo) para produção de pectinases por meio da fermentação semi-sólida e o microrganismo *Aspergillus niger* mutante CCT 0916;
- utilização da metodologia de planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central com a finalidade de observar a influência das variáveis independentes, umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, para determinar as melhores faixas das condições do processo de fermentação semi-sólida;
- determinação da quantidade de substrato necessária para obter a atividade máxima de poligalacturonase (enzima bruta);
- estudo da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto obtido após o processo fermentativo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Maracujá

2.1.1 Generalidades e características do maracujá

Originário de regiões tropicais, o maracujá encontra no Brasil condições excelentes para seu cultivo. Maracujá e maracujazeiro são designações de diferentes espécies da família Passifloraceae, todas do gênero *Passiflora* (EMBRAPA, 2004). Cerca de 150 espécies de *Passiflora* são nativas do Brasil, das quais 60 produzem frutos que podem ser aproveitados direta ou indiretamente como alimento (IBGE, 2002).

É uma cultura com longo período de safra, de 8 meses no Sudeste, de 10 no Nordeste e 12 meses no Norte do País. A espécie mais cultivada é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), por ser mais vigorosa, se adapta melhor aos dias quentes e apresentar frutos de maior tamanho (EMBRAPA, 2004).

A produção de maracujá no Brasil encontra-se à frente de outros países como Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália. A produtividade desta fruta no Brasil esteve em torno de 330,8 mil toneladas, com rendimento de 9,9 t/ha (IBGE, 2002). Por ser de cultivo relativamente fácil, o pequeno produtor encontra no cultivo dessa passifloracea a sua base de sustentação familiar (VIANA et al., 2003).

A casca do maracujá constitui cerca de 53% do peso total do fruto, apresentando, em sua constituição química, razoáveis teores de nutrientes. As sementes e o suco representam 21% e 26%, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2002). O suco pode ser consumido como refresco ou ser empregado no preparo de pudins, sorvetes e geléias. O maracujá é rico em vitaminas do complexo B, e sais minerais como ferro e fósforo.

OTAGAKI & MATSUMOTO (1958) analisaram a composição da casca de maracujá amarelo desidratada (16,80% de umidade) e encontraram valores de 4,60% de proteínas, 0,30% de extrato etéreo, 25,70% de fibra bruta e 20,00% de pectina. CÓRDOVA et al. (2005) também determinaram a composição da casca, encontrando em base seca, 8,68% de cinzas, 26,41% de fibra bruta, 1,50% de proteína. MATSUURA (2005) caracterizou o albedo do maracujá amarelo, os valores encontrados por este autor em base seca foram de 6,80% de proteínas, 1,30% de lipídeos, 7,70% de cinzas, 67,50% de fibra e elevado teor de pectina (27,80%), com

baixo grau de esterificação. ABUD et al. (2007) visando produzir enzimas pectinases, caracterizou o resíduo desidratado do processamento do maracujá (casca, albedo e sementes), e obtiveram 9,01% de pectina, 4,41% de cinzas, 47,00% de fibra, 0,41% de proteína bruta. OLIVEIRA (2007), também caracterizou a casca do maracujá, obtendo em base úmida, aproximadamente 92,00% de umidade, 0,66% de cinzas, um teor de 1,09% em açúcares redutores e 3,10% de pectina.

2.2 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média das plantas, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células vegetais superiores (ALKORTA et al., 1998).

Quimicamente é um complexo coloidal de polissacarídeos, composto de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil (KASHYAP et al., 2001).

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em quatro tipos principais: protopectina, ácido péctínico, ácido péctico e pectina (KASHYAP et al., 2001).

2.2.1 Protopectina

Substância péctica insolúvel em água, presente em tecidos intactos.

2.2.2 Ácido péctico

Substância solúvel em água, compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxilas estão essencialmente livres de grupos metil éster.

2.2.3 Ácido péctínico

São cadeias de poligalacturonas com até 75% de unidades de galacturonatos metilados.

2.2.4 Pectina

Designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster. Em uma fruta verde, a pectina é ligada a microfibras celulósicas na parede de célula. Essa pectina é insolúvel e conseqüentemente confere rigidez as paredes da célula. Porém, durante o amadurecimento a estrutura da pectina é alterada através de enzimas naturalmente presentes nas frutas. Estas alterações envolvem o desarranjo da cadeia de pectina ou de correntes laterais presas às unidades que compõem a cadeia principal. O resultado é que a molécula de pectina fica mais solúvel.

Na Figura 2.1 tem-se a estrutura de uma molécula de pectina. Embora o ácido D-galacturônico seja o principal açúcar constituinte das substâncias pecticas em geral, proporções variáveis de outros açúcares, tais como D-galactose, L-arabinose, D-xilose, também podem ser encontrados (BRANDÃO & ANDRADE, 1999). Os açúcares associados ao ácido galacturônico atuam como agente desidratante e diminuem a solubilidade da pectina. Por outro lado, pectinas com elevado grau de metilação ou esterificação são menos solúveis em água do que pectinas com baixo grau de metilação ou esterificação (PEREIRA, 2005).

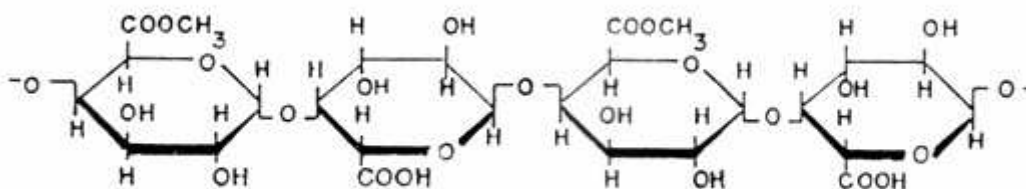


Figura 2.1 – Fragmento de uma molécula de pectina.

(Fonte: COURI, 1993)

Na Tabela 2.1 encontra-se o percentual de pectina em alguns resíduos de frutas.

Tabela 2.1 - Percentual de pectina em alguns resíduos de frutas

Resíduo de frutas	Pectina (% pectato de cálcio)	Referência
Goiaba	5,30 (b.s.)	ABUD et al. (2007)
Acerola	3,25 (b.s.)	ABUD et al. (2007)
Umbu	13,70 (b.s.)	ABUD et al. (2007)
Pedúnculo de caju	11,54 (b.s.)	SANTOS (2007)
Maracujá (casca, albedo)	3,10 (b.u.)	OLIVEIRA (2007)
Abacaxi (coroa)	0,73 (b.u.)	OLIVEIRA (2007)

2.3 Enzimas pectinolíticas

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO et al., 2000).

O mercado mundial de enzimas é atendido por um número relativamente pequeno de empresas. Da produção mundial de enzimas industriais, 60% pertencem à Europa, e o restante aos Estados Unidos e Japão (BHAT, 2000).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas presentes nas células vegetais (MARTIN et al., 2007). São produzidas pela maioria das plantas superiores, por fungos filamentosos, por algumas bactérias e por poucas leveduras. Das preparações enzimáticas que se encontram no mercado, cerca de 75% do total, contêm normalmente as principais enzimas hidrolíticas, como poligalacturonase, celulase e hemicelulase (COURI et al., 2000). Nas últimas décadas, o uso de celulases, hemicelulases e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil, papel e celulose (BHAT, 2000). Por volta de 1930 as pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas (KASHYAP et al., 2001). Segundo, JAYANI et al., 2005 correspondem a 25% do valor global de enzimas alimentícias comercializadas).

2.3.1 Classificação das pectinases

A classificação destas enzimas está baseada nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos, pela preferência de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo) ou terminal (exo) (UENOJO, 2003; KASHYAP et al., 2001). Existem basicamente três tipos de pectinases: pectinaesterase remove os grupos metil éster; as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina e as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas (JAYANI et al., 2005; UENOJO, 2003).

2.3.1.1 Pectinaesterases (PMGE) são também conhecidas como polimetilgalacturonato esterase (ALKORTA et al., 1998). Estas enzimas catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico.

A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase (PG). As pectinesterases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécticas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (ALKORTA et al., 1998).

2.3.1.2 Protopectinases: são enzimas que hidrolisam a protopectina insolúvel gerando a pectina polimerizada solúvel. São classificadas em dois tipos: o tipo A que reage com a região de ácido poligalacturônico da protopectina e a do tipo B reage com as cadeias de polissacarídeos que podem se conectar com as cadeias de ácido poligalacturônico e os constituintes das paredes celulares (UENOJO, 2003; ALKORTA et al., 1998).

2.3.1.3 Despolimerases: catalisam a quebra das ligações glicosídicas α (1→4) entre os monômeros do ácido D – galacturônico. Essas enzimas atuam em pectinas por mecanismos de hidrólise, catalisando a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, ou por transeliminação (liases).

As despolimerases podem ser subdivididas, dependendo da preferência da enzima pelo substrato:

2.3.1.3.1 *Liases*: são também conhecidas como transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (KASHYAP et al. 2001).

- **Pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL)**: são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de transeliminação de hidrogênio. Estas enzimas são subdivididas em dois tipos, as endo liases, que catalisam de forma randômica a ruptura das ligações α (1→4) da pectina e as exo liases, que catalisam a ruptura das ligações α (1→4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Atuam preferencialmente no ácido pectínico (MARTIN, 2006).
- **Pectato liase (poligalacturonato liases, PGL)**: São liases que têm preferência por ácido pectico (ácido poligalacturônico com baixos níveis de esterificação). Podendo ser classificadas ainda como endo ou exo (MARTIN, 2006).

2.3.1.3.2 *Hidrolases*: incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases, podem apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) (UENOJO, 2003)

- **Poligalacturonases – PG**: são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) da cadeia de ácido poligalacturônico (MARTIN, 2006). São as mais extensivamente estudadas entre as enzimas pectinolíticas (JAYANI, et al. 2005). As endopoligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas α (1→4) internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico, enquanto as exopoligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (MARTIN, 2006). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuir ótimo de atividade na região levemente ácida (ZHENG & SHETTY, 2000).
- **Polimetilgalacturonases – PMG**: têm preferência pelo substrato altamente metoxilado (ácido pectínico) (MARTIN, 2006).

Na Figura 2.2, é possível observar como as enzimas pectinolíticas atuam sobre uma molécula de pectina, conforme a classificação anteriormente mencionada.

Nas situações em que é necessária uma hidrólise completa da pectina, deverá ser utilizada uma preparação de enzima contendo todas as enzimas pécicas, incluindo a pectinaesterase. Uma vantagem associada à utilização de preparações sem pectinaesterase é a não produção de metanol (PEREIRA, 2005).

A pectólise, ação das enzimas pectinolíticas, é um fenômeno importante, associado a muitos processos biológicos, tais como crescimento de plantas, amadurecimento de frutas e perda de folhas (CASTILHO, 1997).

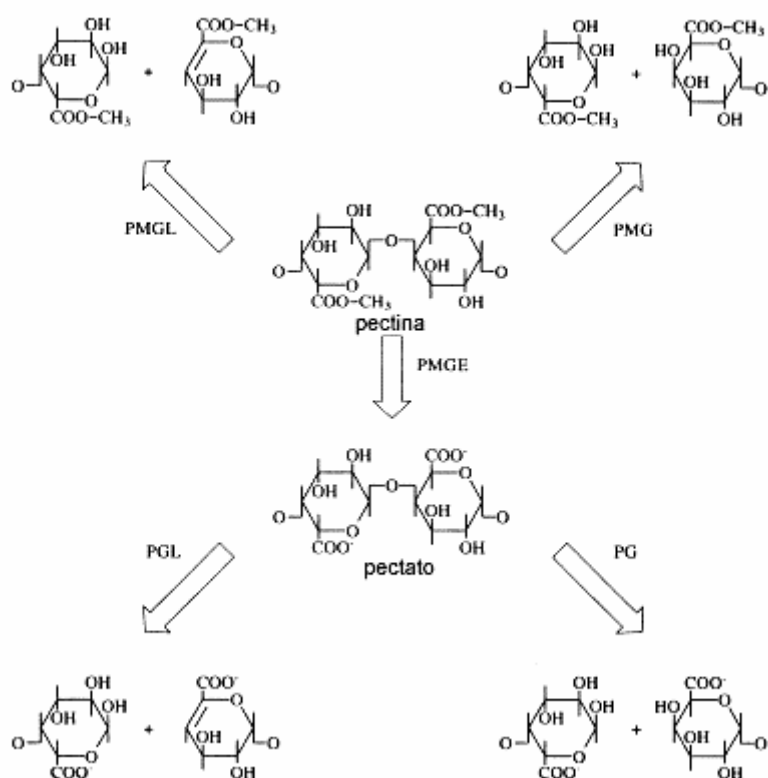


Figura 2.2 – Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina (Fonte: ALKORTA et al.,1998)

2.3.2 Aplicação industrial das enzimas pectinolíticas

Durante meados da década de 30, quando as indústrias de frutas começaram a produzir suco, o rendimento era baixo e muitas dificuldades foram encontradas para filtrar o suco e se atingir uma clarificação aceitável. A partir de então, pesquisas

utilizando pectinases, celulases e hemicelulases de microrganismos (*Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp.), juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, ajudaram a superar estas dificuldades (BHAT, 2000). Industrialmente, as pectinases apresentam ampla utilização nas indústrias de alimentos e bebidas, a seguir estão descritos alguns aspectos dessas e de outras aplicações.

A Tabela 2.2 apresenta com mais detalhes algumas funções das pectinases na indústria de bebidas e alimentos.

Tabela 2.2 – Funções e aplicações das pectinases na indústria de alimentos e de vinhos

Enzima	Função	Aplicação
Enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Hidrólise de pectina e de componentes de paredes celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas	Melhoramento na extração de sucos de frutas e óleo de oliva.
Poligalacturonase, pectina transeliminase e hemicelulase	Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados	Clarificação de sucos de frutas
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase	Processamento de frutas	Produção de ketchup de alta qualidade e de polpa de frutas
Pectina esterase	Desesterificação	Melhoramento na clarificação da cidra
Enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor de uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação de vinhos.

Fonte: JAYANI et al., (2005)

2.3.2.1 Indústrias de sucos de frutas

A principal aplicação dessas enzimas está na indústria de processamento de sucos, sendo usadas nas etapas de extração, clarificação e concentração (MARTIN, 2006). As vantagens do uso de pectinases em sucos incluem, por exemplo, utilização em sucos

clarificados, não clarificados, concentrados, polpas e purês; redução do tempo total para extração do suco, auxiliam na produção de sucos e concentrados estáveis com redução de resíduos da polpa; custos de produção reduzidos e possibilidade de processamento de diferentes frutas (UENOJO & PASTORE, 2007; KASHYAP et al., 2001). No caso do suco de laranja, aplicam-se pectinases, porém é importante que permaneça certo teor de pectina insolúvel em suspensão de modo a dar ao suco a sua aparência tipicamente turbida (CASTILHO, 1997).

Na produção de suco de maracujá as enzimas têm sido adicionadas em uma etapa precedente à filtração, quando há a hidrólise enzimática da estrutura vegetal resultando na degradação dos sólidos em suspensão e diminuição da viscosidade, assim agiliza-se todo o processo (PAULA et al., 2004).

2.3.2.2 Indústria de vinhos

A adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco e reduz o tempo de clarificação. Preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina esterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (BHAT, 2000). Enzimas pectinolíticas adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto resultam no melhoramento das características visuais (cor e turbidez) (JAYANI et al., 2005).

2.3.2.3 Extração de óleos

Óleos de canola, de coco, semente de girassol e oliva são tradicionalmente produzidos por extração com solventes orgânicos, mais comumente o hexano. A pectinase pode ser usada para extrair óleo vegetal em um processo aquoso, liquefazendo os componentes estruturais da parede celular das sementes que contém o óleo (KASHYSP et al., 2001). Recentemente, preparações comerciais enzimáticas contendo pectinases, celulases e hemicelulases começaram a serem utilizadas para extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração (UENOJO & PASTORE, 2007; KASHYSP et al., 2001).

A preparação de enzima comercial, Olivex (uma preparação de pectinase com baixos níveis de celulase e hemicelulase de *Aspergillus aculeatus*) foi a primeira

mistura de enzima usada para melhorar a extração de óleo de oliva. O uso de enzimas de maceração aumenta a quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a extração, melhora a centrifugação (BHAT, 2000).

2.3.2.4 Indústria têxtil

Na indústria têxtil, pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami (BRAVO et al., 2000).

2.4 Fermentação semi-sólida na produção de pectinases

O processo de fermentação semi-sólida (FSS) tem se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários produtos como enzimas (CASTILHO, 1997; COURI, 1993; MARTIN, 2006; SANTOS, 2007); ácidos orgânicos (RODRIGUES et al., 2007); aromas (UENOJO, 2003) e bioherbicidas (MORAES et al., 2007). Tanto o processo de fermentação semi-sólida (FSS) quanto o de fermentação submersa (FSM) apresentam características importantes, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser utilizado.

O termo fermentação semi-sólida (FSS), ou em estado sólido (FES), ou fermentação em meio semi-sólido referem-se à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou solução umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células, e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

Na FSS podem ser destacadas algumas características: alta produtividade, alta concentração dos produtos e também menor requerimento de espaço e energia. Por outro lado, apresentam dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de

umidade, o que acaba favorecendo o uso de fungos filamentosos no processo, devido os mesmo se adaptarem bem a essa condição (PANDEY et al., 1999).

Os principais fatores que afetam a síntese microbiana de enzimas em um sistema de FSS incluem: seleção de um substrato satisfatório e microrganismo; pré-tratamento do substrato; tamanho de partícula (espaço inter-partícula e área superficial) do substrato; umidade e atividade de água (a_w) do substrato; temperatura da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade no ambiente do sistema em FSS, taxa de consumo de oxigênio (PANDEY et al., 1999).

2.4.1 Microrganismo

Geralmente, enzimas hidrolíticas como as pectinases, são produzidas por culturas de fungos (PANDEY et al., 1999). Para fungos filamentosos, as condições de crescimento em fermentação semi-sólida se aproximam mais do habitat natural que as observadas em meios de cultura submersos. Desta forma, estes tipos de microrganismos são capazes de produzir e excretar grandes quantidades de enzimas (CASTILHO et al., 2000), inclusive as pectinolíticas.

Os fungos filamentosos *Aspergillus* e *Penicillium*, bactérias do gênero *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Erwinia*, poucas leveduras, como, por exemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococci* e *Rhodotorula*, conseguem evidenciar atividade pectinolítica. Em escala industrial, são obtidas a partir da fermentação de fungos filamentosos como *Aspergillus niger* (PEREIRA, 2005). As espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* são frequentemente usadas por causa da alta atividade pectinolítica exibida por membros do gênero (FAWOLE & ODUNFA, 2003). A cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado (PANDEY et al., 1999). Na literatura, vários autores utilizaram o *Aspergillus niger* para produção de enzimas pectinolíticas, dentre eles SANTOS (2007), FONTANA et al. (2005), PANAROTTO et al. (2003), TERZI et al. (2003), CASTILHO (1997).

O fungo filamentoso tem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intraganglionares por meios mecânicos ou enzimáticos, com a firme fixação das hifas na superfície do substrato e posterior intensa ramificação e penetração na parede celular do substrato pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelos microrganismos (DEL BIANCHI et al., 2001). Vários fungos filamentosos crescem

bem a baixos valores de pH, uma combinação de baixa atividade de água e baixo pH em alguns sistemas de FSS criam um ambiente que é favorável para crescimento de fungos, mas impede o crescimento bacteriano e de leveduras. A maioria dos fungos filamentosos produz esporos. Inóculos de esporos são fáceis de preparar e podem ser armazenados por períodos mais longos do que células vegetativas (MITCHELL et al., 2000).

2.4.2 Substrato

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO et al., 2000).

Os resíduos agroindustriais são geralmente os melhores substratos para processos de fermentação semi-sólida, e a produção de enzimas não é uma exceção. A seleção de um substrato para esta finalidade depende de vários fatores, principalmente relativo ao custo e disponibilidade, envolvendo assim diversos destes resíduos (PANDEY et al., 1999). A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros, o que significa uma ótima contribuição para o desenvolvimento da economia. Entretanto, a grande produção desses materiais agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

O material sólido atua como fonte de nutrientes para a cultura de microrganismos e também como suporte para as células (PANDEY, 2003). Farelos, cascas, bagaços de frutas da agroindústria (maça, maracujá, pedúnculo de caju) e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação (PINTO et al., 2006).

Muitos substratos sólidos são complementados com fontes solúveis de nitrogênio durante a sua preparação, já que o nitrogênio é um nutriente importante no desenvolvimento microbiano (MITCHELL et al., 2000). Muitos fungos obtêm o nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, como nitratos e sais de amônia. Porém, alguma espécie exigem substratos nitrogenados orgânicos.

A glicose é uma fonte de carbono adequada, assim como outros açúcares (sacarose e maltose), e ainda outros compostos orgânicos mais complexos, por exemplo, amido e celulose (PELCZAR et al., 1980). Segundo FONTANA et al. (2005), substratos que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina tem mostrado altos rendimentos em enzimas. A presença de pectina no meio, além do efeito indutivo, favorece a excreção de pectinases pelos fungos produtores (PANDEY et al., 1999). FAWOLE & ODUNFA (2003) estudando a produção de pectinases por *Aspergillus niger*, concluíram que quando são adicionadas concentrações diferentes de glicose ao meio contendo pectina, a produção de enzimas pécnicas é inibida com concentrações altas de glicose, enquanto baixas concentrações (< 0,5% m/v) estimulam a produção da enzima. Concentrações altas de glicose no meio provavelmente satisfazem a exigência de crescimento do microrganismo e a quebra da pectina no meio é desnecessária ou mínima e assim é observada uma baixa atividade enzimática nessas culturas. Contudo, com baixas concentrações de glicose, surge a necessidade da quebra da pectina em formas que podem ser metabolizadas pelos microrganismos e dessa forma a atividade aumenta.

Geralmente substratos sólidos naturais precisam de algum tipo de pré-tratamento para deixar seus componentes químicos mais acessíveis e sua estrutura física mais suscetível para penetração de micélios. Pré-tratamentos físicos envolvem a trituração ou moagem para reduzir o tamanho das partículas, tornando-as mais acessíveis. O pré-tratamento químico com ácido ou álcali em temperaturas altas pode romper barreiras de dentro da partícula para difusão, e também pode ser importante na hidrólise de macromoléculas, produzindo nutrientes solúveis (MITCHELL et al., 2000).

2.4.3 Tamanho da partícula

O tamanho da partícula e forma é extremamente importante. Afetam a relação área superficial e o volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas (MITCHELL et al., 2000). Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana e podendo resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, limitam a superfície para ataque microbiano. Isto necessita um tamanho de partícula

para um processo particular (PANDEY et al., 1999). Segundo MITCHELL et al. (2000) o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho menores que 1 mm a 1 cm tem sido freqüentemente usadas em FSS.

2.4.4 Temperatura

A temperatura é um fator crítico em sistemas de FSS, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura no meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura (PINTO et al., 2006). Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos e a formação do produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI et al., 2001). Há variações na temperatura ótima para diferentes espécies de *Aspergillus* na produção de pectinases (FAWOLE & ODUNFA, 2003). Alguns autores, por exemplo, FONTANA et al. (2005), PANAROTTO et al. (2003) e, CASTILHO et al. (2000), utilizaram a temperatura de 30 °C, trabalhando com *Aspergillus niger* na produção de pectinases, enquanto FAWOLE & ODUNFA (2003), utilizaram 40 °C trabalhando com a mesma espécie do microrganismo.

2.4.5 pH

O pH apresenta-se como um dos parâmetros relevantes à adequada performance do processo sendo, porém, considerado uma barreira difícil de ser superada, uma vez que o controle de pH utilizado em fermentações submersas torna-se impraticável no caso de FSS (DANIEL & TRINDADE, 1996). O pH é uma variável importante nos processos biológicos, havendo valores de pH específicos para o desenvolvimento de cada microrganismo. Para os fungos estes valores estão entre 4,5 – 5,0, e as bactérias preferem a faixa 6,5 – 7,0. O controle do pH durante a fermentação em estado sólido é difícil, pelas características heterogêneas dos materiais utilizados. A fonte de nitrogênio pode representar um papel importante afetando as mudanças de pH no substrato durante a fermentação. Segundo CASTILHO (1997) os valores de pH ótimo de algumas enzimas de *Aspergillus niger* são bastante baixos (pH igual a 4) o que viabiliza seu

largo emprego no processamento de frutas. ZHENG & SHETTY (2000) estudando enzimas produzidas por *L. edodes* e considerando o pH natural de frutas, tecidos vegetais e sucos como sendo ácido, afirma que estas poderão ser utilizadas nos processos de extração e clarificação de sucos, sem sofrer perda considerável da sua atividade.

2.4.6 Aeração

A aeração está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fenômeno de secagem. Este fenômeno é indesejável em todos os sistemas de fermentação semi-sólida, pois a desidratação do meio faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos seja lenta ou nula. O desenvolvimento microbiano requer um grande consumo de oxigênio, logo a passagem de ar através do meio permite elevadas taxas de crescimento e produtividade (PINTO et al., 2006).

2.4.7 Umidade e atividade de água

De todos os parâmetros em um processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FSS, devido ao grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. Na FSS, a água está relacionada a dois parâmetros. O primeiro, a umidade, que diz respeito à porcentagem de água na massa total de meio. O segundo, a atividade de água (a_w), que relaciona a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. A atividade de água afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2006).

Durante a fermentação, haverá uma perda de umidade devido à evaporação e às atividades metabólicas microbianas (DEL BIANCHI et al., 2001). O aumento da umidade pode levar ao decréscimo de porosidade, de aeração do sistema e alterações na estrutura e textura da partícula.

O controle da umidade na fermentação semi-sólida pode ser utilizado para modificar a produção e excreção de metabólitos (PANDEY, 1992). O metabolismo dos microrganismos é fortemente influenciado pelas condições de atividade de água. Pelo controle da atividade da água, pode-se regular a fermentação e formar condições favoráveis para a biossíntese do produto desejado (PANDEY, 2003).

Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água necessário ao seu metabolismo. Na Tabela 2.3 é possível observar alguns valores de atividade de água para alguns fungos.

Tabela 2.3 – Quantidade mínima de atividade de água necessária a sobrevivência de fungos

Fungos	Atividade de água (a_w)
<i>Aspergillus restrictus</i>	0,70
<i>Aspergillus halophilicus</i>	0,68
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,73
<i>Aspergillus candidus</i>	0,80
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,80
<i>Aspergillus flavus</i>	0,85
<i>Aspergillus niger</i>	0,77*
<i>Penicillium</i> (diversas espécies)	0,85

Fonte:* AFONSO JÚNIOR et al. (2003); LEITÃO (1997)

PANDEY (1992) cita que durante uma fermentação em estado sólido para fungos filamentosos, altas atividades de água favorecem a esporulação, enquanto que para baixas atividades de água há o favorecimento de crescimento micelial ou germinação dos esporos.

CASTILHO (1997) utilizando farelo de trigo e soja para produção de pectinases com teores iniciais de umidade de 25, 40, 55 e 70%, correspondendo a valores de a_w iguais a 0,90; 0,95; 0,98 e 0,99, respectivamente, verificou que teores entre 40 e 55% são os mais propícios à síntese dessas enzimas pelo fungo *Aspergillus niger*. TERZI et al. (2003), estudando a influência da concentração de inóculo ($10^5 - 10^7$ conídios/mL) do microrganismo *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio (40-50%) sobre a produção da enzima PG, encontraram que em teores menores de umidade inicial e maior concentração de inóculo foram apropriadas para a produção de PG. Em condição desfavorável do processo, ou seja, em nível menor de umidade, o *Aspergillus niger* 3T5B8 expressou melhor seu potencial de síntese de PG. SANTOS (2007) usando pedúnculo de caju seco para produção de pectinases encontrou que os maiores valores

de atividade enzimática foram obtidos para níveis de umidade em torno de 40% e a_w igual a 0,92.

2.4.7.1 Isotermas de sorção

A isoterma de sorção de umidade representa graficamente a relação entre a atividade de água de um produto em função de seu teor de umidade, a uma dada temperatura (ALVES, 1997).

Existem diversas equações disponíveis na literatura que descrevem a relação entre a atividade de água e o conteúdo de umidade a uma determinada temperatura em alimentos. As equações de três ou mais parâmetros, quase sempre, fornecem melhores resultados na predição (PENA et al., 2000).

Apesar de suas limitações, com alcance restrito de atividade de água (0,3 – 0,4) (TIMMERMANN et al., 2001), o modelo de Brunauer, Emmett and Teller (BET), (Tabela 2.4), é ainda usado para o cálculo do valor da umidade na monocamada por ser recomendada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) (TIMMERMANN, 2003). O modelo de Guggenheim, Anderson e de Boer (GAB), (Tabela 2.4) é considerado adequado para representar os dados experimentais na faixa de atividade de água (0,1 – 0,9) de interesse mais prático em alimentos (IGLESIAS & CHIRIFE, 1995).

Tabela 2.4 – Modelos matemáticos para o ajuste de isotermas

Modelos	Equação
BET	$XE = \frac{X_M \cdot C_B \cdot a_w}{(1 - a_w)} \cdot \left[\frac{1 - (n + 1) \cdot (a_w)^n \cdot n \cdot (a_w)^{n+1}}{1 - (1 - C_B) \cdot a_w - C_B \cdot (a_w)^{n+1}} \right] \quad (1)$
GAB	$XE = \frac{X_M \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} \quad (2)$

Em que:

XE – umidade de equilíbrio (base seca)

a_w – atividade de água

X_M – umidade na monocamada molecular

C_B – constante de BET

C – constante relacionada ao calor de sorção da camada molecular

K – fator de correção das propriedades das moléculas na multicamada

n – número de camadas moleculares

2.5 Trabalhos desenvolvidos na produção de pectinases

Muitos trabalhos estão sendo realizados para produção de pectinases. A seguir encontra-se detalhes de diversos trabalhos desenvolvidos, enfatizando as condições de estudo e alguns resultados obtidos pelos autores.

TRINDADE et al. (1996) utilizaram rejeitos de frutas (maça, laranja, acerola, maracujá e morango) como substrato. A casca de maçã produziu os melhores resultados, com a produção de PG em 22 horas de fermentação e atividade enzimática de 14 U/mL.

HENNIES (1996) estudou a produção de pectinases por fermentação submersa e semi-sólida pelo fungo *Penicillium italicum* IZ 1584. Verificou que o microrganismo é capaz de produzir estas enzimas, sendo esta atividade incrementada quando a sacarose está presente no meio de cultivo nos dois tipos de processos fermentativos. A atividade de pectinase apresentou pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 45 °C.

ZHENG & SHETTY (2000) utilizaram resíduos de indústrias de processamento de frutas (morango e maçã) para a produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido por *Lentinus edodes*. A atividade enzimática aumentava significativamente nos estágios iniciais de crescimento e atingiu o nível máximo em 40 dias, nos meios contendo as polpas. A polpa de morango foi o melhor substrato para produção de poligalacturonase, seguido da polpa de maçã. A atividade enzimática máxima para o meio contendo polpa de morango foi à temperatura de 50 °C e pH 5,0.

PANAROTTO et al. (2003) utilizando como fonte de pectina cascas de limão Taiti na produção da enzima poligalacturonase (PG) e como substrato farelo de trigo, verificaram que o pico de atividade foi alcançado quando 80% de cascas secas de limão Taiti foram utilizadas como fonte de indutor, chegando em 72 horas de fermentação a 43 e 80 U/grama de meio sólido para a endo e exo-PG, respectivamente.

TERZI et al. (2003) estudaram a produção de PG por *Aspergillus niger* 3T5B8 e farelo de trigo como substrato. Observaram a influência da concentração de inóculo e umidade do meio de fermentação sobre a produção da enzima e observaram que a combinação entre a menor umidade inicial e a maior concentração de inóculo foram

apropriadas a produção da enzima, atingindo 33 U/mL em 64 horas de processo fermentativo.

FONTANA et al. (2005) estudando o efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonase por *Aspergillus niger* em meio sólido constaram que a adição de pectina cítrica em meio sólido a base de farelo de trigo, até o limite de 16% (m/m), afetou positivamente o crescimento de *A. niger*, reprimindo, entretanto, a formação de exo-PG. Por outro lado, demonstraram que o efeito repressivo do indutor pode ser reduzido utilizando-se uma mistura de 6% (m/m) de pectina cítrica e 10% (m/m) de glicose no meio.

BOTELLA et al. (2007) observaram o efeito da umidade inicial e a suplementação com uma fonte de carbono na produção de pectinase e xilanase por *Aspergillus awamori*, com polpa de uva como substrato. Quando estudaram o meio contendo 6% de glicose, a produção de ambas as enzimas aumentou significativamente, mas com glicose na concentração de 8% a atividade enzimática diminuiu. A máxima produção foi de aproximadamente 40 U/mL em 48 horas de cultivo.

MARTIN et al. (2007) trabalharam com fermentação semi-sólida avaliando qual melhor substrato para produção de PG *Rhizomucor* sp N31. Utilizando uma mistura de farelo de trigo (50%) e bagaço de cana-de-açúcar (50%) obtiveram 110 U/g em 48 horas de fermentação.

SANTOS (2007) estudando a produção de poligalacturonase por fermentação semi-sólida utilizando pedúnculo de caju como substrato e o microrganismo *Aspergillus niger*, obteve com 40% de umidade inicial e 1,0% de nitrogênio uma enzima com atividade 16 U/g de meio fermentado.

Na Tabela 2.5 são apresentados os resultados de alguns trabalhos desenvolvidos na produção de pectinases, enfocando o tipo de substrato, o microrganismo e a máxima atividade enzimática obtida.

Tabela 2.5 – Resumo de trabalhos desenvolvidos para produção de enzimas pectinolíticas em meio FSS, utilizando diversos substratos e microrganismos

Enzima	Substrato	Microrganismo	Atividade enzimática	Referência
Pectinases	Casca de maçã	<i>Aspergillus niger</i>	14,0 U/mL	TRINDADE et al. (1996)
PG	Polpa de morango	<i>Lentinus edodes</i>	29,4 U/g	ZHENG & SHETTY (2000)
	Polpa de maçã		20,1 U/g	
	Polpa de framboesa		14,0 U/g	
Endo-PG	Farelo de trigo e cascas de limão Taiti	<i>Aspergillus niger</i> T0005007-2	43,0 U/g	PANAROTTO et al. (2003)
Exo-PG	como indutor		80,0 U/g	
PG	Farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	33,0 U/mL	TERZI et al. (2003)
Endo-PG	Farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	140,0 U/g	FONTANA et al. (2005)
Exo-PG		T0005007-2	370,0 U/g	
Exo-PG	Polpa de uva	<i>Aspergillus awamori</i>	38,0 U/g	BOTELLA et al. 2007
PG	Uma mistura farelo de trigo, e bagaço de cana-de-açúcar	<i>Rhizomucor</i> sp N31	110,0 U/g	MARTIN et al. (2007)
PG	Pedúnculo do caju	<i>Aspergillus niger</i> mutante CCT 0916	16,0 U/g	SANTOS (2007)

2.6 Algumas considerações sobre a estabilidade das enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas e, como tal, apresentam especialidades para os inúmeros substratos que entram nas reações do metabolismo (SGARBIERI, 1996).

A desnaturação de proteínas é uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que haja alteração na seqüência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias, que ligam aminoácidos entre si (SGARBIERI, 1996).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas o calor é que provoca mais modificações nas proteínas, dentro do contexto biológico (GOMES et al., 2007).

As proteínas possuem temperaturas características nas quais apresentam o máximo de estabilidade. A maioria das proteínas são mais estáveis a temperatura de refrigeração, outras são mais estáveis a temperatura ambiente. À medida que a temperatura se eleva acima de 40 – 50 °C, praticamente, todas as proteínas tornam-se instáveis, tendendo a uma alteração da conformação original. Quanto ao pH algumas proteínas mantêm suas configurações nativas a valores de pH muito baixos, se a temperatura for mantida baixa. Outras, são drasticamente desdobradas, de tal forma que apenas um pequeno decréscimo no pH é suficiente para induzir mudanças de conformação semelhantes àquelas que as proteínas mais estáveis só experimentam pela ação combinada do calor e pH baixo (SGARBIERI, 1996).

Devido às condições de processamento na indústria, como elevadas temperaturas, as enzimas podem se tornar instáveis e se tornarem totalmente inativas durante o processo, assim torna-se importante conhecer certas características das enzimas para avaliar qual melhor faixa de operação para cada uma.

Alguns trabalhos além da produção da poligalacturonase realizaram também estudos de estabilidade enzimática. Por exemplo, ZHENG & SHETTY (2000) verificaram o efeito da temperatura e pH na estabilidade da poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* utilizando resíduos de frutas como substrato. A enzima manteve-se estável em temperaturas acima de 50 °C, apresentando 90% da atividade máxima obtida, mas foi completamente desativada quando incubada a 85 °C por 20 minutos. Quanto ao

pH, esta PG apresentou alta tolerância a valores de pH baixos (3,5 – 6,5). Os autores ressaltam que, a partir de resíduos das indústrias que processam frutas, é possível obter enzimas com características de resistência a valores de pH ideais para aplicação industrial.

NAIDU & PANDA (2003) estudaram o efeito do pH e da temperatura na desativação de enzimas pectinolíticas produzidas por fermentação submersa num meio composto por glicose, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e o microrganismo *Aspergillus niger* como agente da fermentação. Neste trabalho foi determinada a taxa de desativação das enzimas polimetilgalacturonases (PMG), poligacturonase (PG) e pectinaliase (PMGL) quando incubadas a diferentes temperaturas e pH, sendo a PMGL considerada a mais estável entre as enzimas estudadas. Para cada uma destas enzimas foi utilizado faixas de pH e temperatura. No caso da PG, o pH selecionado esteve entre 4,5 e 7,5 e as temperaturas estudadas foram de 25, 28, 40, 50 e 60 °C. A combinação de pH e temperatura sobre a qual observou-se uma menor taxa de desativação foi 4,8 e 28 °C, respectivamente.

MARTINS et al. (2005) também utilizaram fermentação submersa para caracterizar uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus*. Foi investigada a estabilidade térmica e estabilidade frente às variações do pH para esta enzima. Em pH 3,0 – 3,5 a poligacturonase manteve, cerca de 91% da atividade original. Em valores de pH elevados houve uma queda na estabilidade. No caso da temperatura, para valores até 50 °C, a poligalacturonase conservou 80% da sua atividade original e manteve apenas 6% dessa atividade quando exposta a uma temperatura de 70 °C.

3. Material e métodos

Local de realização do trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

3.1 Preparação do substrato

Foi utilizado o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), semi-maduro, adquirido na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas) em Campina Grande – PB.

Os frutos foram colocados em um recipiente com água proveniente da rede de abastecimento da CAGEPA (Companhia de Água e Esgotos da Paraíba), durante 30 minutos. Em seguida, foram novamente lavados com água corrente para remover alguma substância remanescente.

3.2 Caracterização

3.2.1 Avaliação do percentual de casca e albedo dos frutos do maracujá

Após a lavagem, os frutos foram pesados inteiros, a seguir pesou-se isoladamente a polpa e a casca e o albedo. Este último conjunto foi triturado em liquidificador e seco em estufa com circulação de ar, na temperatura de 55 °C, conforme SANTOS (2007), por aproximadamente 15 horas. O resíduo seco foi moído e armazenado em recipientes de vidro, herméticos, a temperatura ambiente.

3.2.2 Caracterização do resíduo seco

As amostras utilizadas na caracterização foram tomadas segundo o método do quarteamento, de acordo com a NP-1379 (NP, 1976). O material seco foi vagarosamente misturado para evitar agregação das partículas menores, e então

amontoado em forma de cone. O monte em cone foi achatado e dividido em quatro partes, sendo recolhidas duas partes diagonalmente opostas que constituíram a amostra reduzida. Este processo foi repetido até obter a quantidade de material necessária para as análises.

Para a caracterização foram determinadas a granulometria do resíduo seco, densidade aparente, densidade real, porosidade, pH, cinzas, umidade, °Brix, açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores (AR), pectina e proteína total, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.2.2.1 Granulometria

A distribuição granulométrica foi feita utilizando-se 100 g do material colocados em conjunto de peneiras Produteste com 14, 20, 24, 35, 48 e 60 mesh e agitados na frequência nove do agitador mecânico por um tempo de 20 minutos, conforme a NBR – 7181 (ABNT, 1984). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso total do material.

3.2.2.2 Densidade aparente

Para a densidade aparente foram pesados 100 g do material e depois colocados em uma proveta, sem compactação, para determinação do volume ocupado. O valor da densidade aparente foi obtida após aplicação da Equação 3.1:

$$densidade\ aparente = \frac{massa, g}{volume\ ocupado, cm^3} \quad (3.1)$$

3.2.2.3 Densidade real

A densidade real do resíduo seco foi determinada a partir da relação entre a massa e o volume da amostra, através do deslocamento de um líquido (óleo de cozinha) em uma proveta. Primeiramente foi colocado óleo em uma proveta e verificou-se o volume ocupado (V_1), em seguida adicionou-se uma massa conhecida do resíduo (100 g) e esperou-se que a mesma se depositasse totalmente no fundo da proveta. Por fim, fez-se

a leitura do novo volume indicado pelo nível do óleo (V_2). A diferença ($V_2 - V_1$) é o volume real do pó.

Desta forma, a densidade real foi determinada pela Equação 3.2:

$$\text{densidade real} = \frac{\text{massa, g}}{(V_2 - V_1), \text{ cm}^3} \quad (3.2)$$

3.2.2.4 Porosidade

A porosidade foi determinada conforme a Equação 3.3 (KEEY, 1991):

$$\text{porosidade} = 1 - \frac{\text{densidade real}}{\text{densidade aparente}} \quad (3.3)$$

3.2.2.5 pH

O pH foi medido segundo a metodologia descrita em BRASIL (2005). Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 g da amostra sólida. Após completa homogeneização, seguida de filtração, foi realizada a medida do pH em potenciômetro digital.

3.2.2.6 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada conforme metodologia descrita em BRASIL (2005). Os cadinhos de porcelana vazios foram colocados na mufla e deixados a 550 °C. Depois foram deixados em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesados vazios e com 1 g da amostra. Foram levados a mufla a 550 °C, durante cinco horas, até obter uma cinza de cor clara. Após este tempo foram novamente deixados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem (m/m).

3.2.2.7 Umidade

Para análise da umidade seguiu-se o procedimento de BRASIL (2005), a partir da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca. Pesou-se 1 g da amostra em recipientes já tarados, deixando secar em estufa a 105 °C. Após 24 horas de secagem, as amostras foram colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida pesados em balança analítica. O resultado foi expresso em porcentagem (m/m).

3.2.2.8 °Brix

A leitura do °Brix foi feita de forma direta em refratômetro, segundo o procedimento descrito em BRASIL (2005). Utilizou-se 1 g da amostra para 20 mL de água destilada. Esta suspensão foi homogeneizada, deixada em repouso por 30 minutos, filtrada, e então realizada a leitura. O resultado foi multiplicado pelo fator de diluição para obter o °Brix.

3.2.2.9 Açúcares redutores totais (ART) e Açúcares redutores (AR)

A quantificação dos grupos redutores foi realizada com base na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O procedimento adotado foi o descrito por MILLER (1959).

Para a determinação dos açúcares redutores, dissolveu-se determinada quantidade de amostra em um volume definido de água. Depois transferiu-se 1 mL para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. A seguir, os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 minutos. Após este intervalo, os tubos foram resfriados. Em cada tubo foi adicionado 8 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm.

A determinação de ART foi conforme o método de Somogy-Nelson (DEMIATE et al., 2002) adaptado por CORREIA (2004). Após a diluição, foi realizada a hidrólise ácida da amostra com adição de ácido clorídrico (HCl) 2 N, seguida de aquecimento. Neutralizou-se essa solução acrescentando solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 N. Depois foi seguida a mesma metodologia utilizada em açúcares redutores.

Os resultados foram expressos em gramas de açúcares redutores totais ou açúcares redutores por 100 gramas de amostra inicial (g açúcares/100 g amostra).

3.2.2.10 Pectina

A determinação de pectina foi baseada no procedimento de RANGANA (1979). A extração da pectina foi realizada utilizando HCl 0,05 N seguido de aquecimento por duas horas, substituindo-se a água perdida por evaporação e mantendo-se o volume inicial constante. Foi adicionado NaOH 1 N para neutralização do ácido presente na amostra. As amostras foram deixadas em repouso por 12 horas. Após esse procedimento, sob agitação constante, foi adicionado ácido acético (CH₃COOH) 1 N e após 5 minutos, cloreto de cálcio (CaCl₂) 1 N. Após 1 hora, em repouso, a amostra foi levada à ebulição por 2 minutos, e depois filtrada em papel Whatman n° 1. O papel de filtro com o precipitado foi mantido em estufa a 105 °C até peso constante. As amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas. O teor de pectina foi calculado pela porcentagem de pectato de cálcio.

3.2.2.11 Proteína total

O teor de proteína foi determinado utilizando o método semi-micro Kjeldahl com adaptação para UV-visível a 410 nm, de acordo com a metodologia de SILVA (1998).

3.3 Atividade de água

Para a determinação da atividade de água do substrato foram preparadas amostras com 5 g do resíduo e adicionadas diferentes quantidades de água destilada, de modo a simular as condições de incubação. O volume de água adicionado variou de 0 a 3 mL/ 5 g de resíduo seco. Após umedecido, cada amostra preparada foi colocada em recipientes herméticos e deixado por 24 horas em repouso para uniformizar o meio.

A atividade de água das amostras foi analisada diretamente em equipamento Thermoconstanter Novasina RTD 200 TH2, nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C. Após estabilização do equipamento e escolha da temperatura, colocou-se uma quantidade de cada amostra em cubetas plásticas apropriadas e inseridas no aparelho. A

amostra permanecia no equipamento até que a leitura da atividade de água se estabilizasse. Efetuada a leitura da atividade de água, as amostras foram levadas a estufa a 105 °C por 24 horas para determinação da umidade de equilíbrio (base seca).

As isotermas de adsorção de umidade para cada temperatura estudada foram construídas com os dados de umidade de equilíbrio (base seca) e atividade de água.

Para o ajuste matemático das isotermas de adsorção de umidade, utilizou-se o modelo de GAB (Equação 3.4), com auxílio do software *Statística 5.0*. Os critérios utilizados para determinação da qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foram: o coeficiente de determinação (R^2), o erro relativo (ε), dado pela Equação 3.5 e o desvio percentual médio (P), calculado pela Equação 3.6.

$$XE = \frac{X_M \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} \quad (3.4)$$

$$\varepsilon = \frac{XE_{\text{exp}} - XE_{\text{teo}}}{XE_{\text{exp}}} \quad (3.5)$$

$$P = \frac{100}{n_e} \cdot \sum_{i=1}^{n_e} \frac{|XE_{\text{exp}} - XE_{\text{teo}}|}{XE_{\text{exp}}} \quad (3.6)$$

Onde:

ε – erro relativo

a_w – atividade de água

C – constante relacionada ao calor de sorção da camada molecular

K – fator de correção das propriedades das moléculas na multicamada

n_e – número de dados experimentais

P – desvio percentual médio (%)

XE – umidade de equilíbrio (base seca)

XE_{exp} – umidade de equilíbrio experimental (base seca)

XE_{teo} – umidade de equilíbrio predito pelo modelo (base seca)

X_M – umidade na monocamada molecular

3.3.1 Restabelecimento da umidade no meio

Com os valores dos volumes de água adicionados ao resíduo seco e a determinação da umidade (base úmida) foi possível construir uma curva correlacionando estas duas variáveis, obtendo-se uma relação dada pela Equação 3.7. A partir desta equação, pode-se avaliar a quantidade de água a ser adicionada inicialmente ao substrato para que se restabeleça a umidade desejada.

$$\begin{aligned} \text{volume de água adicionado (mL)} &= 0,1182 \cdot \text{umidade (b.u.)} - 1,9453 \\ R^2 &= 0,986 \end{aligned} \tag{3.7}$$

3.4 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória.

As variáveis dependentes foram a concentração da fonte de nitrogênio (sulfato de amônia), por ser este um nutriente importante no desenvolvimento microbiano e a umidade inicial (U^*). Os valores adotados para as variáveis foram baseados nos valores estudados por SANTOS (2007) que estudou a influência da concentração da fonte de nitrogênio (0, 0,5 e 1%) e da umidade (40, 50 e 60%) sobre a produção de pectinases utilizando pedúnculo do caju.

A matriz de planejamento experimental está apresentada na Tabela 3.1, mostrando as variáveis utilizadas no planejamento suas codificações e os níveis. O planejamento fatorial foi analisado utilizando-se o software Statística 5.0.

Tabela 3.1 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central

Ensaio	Umidade	Nitrogênio
1	- 1 (40)	- 1 (1,0)
2	+1 (60)	- 1 (1,0)
3	- 1 (40)	+ 1 (2,0)
4	+ 1 (60)	+ 1 (2,0)
5	0 (50)	0 (1,5)
6	0 (50)	0 (1,5)
7	0 (50)	0 (1,5)

3.5 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado foi um fungo filamentososo da linhagem *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical, com sede em Fortaleza-CE, cultivado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG), em tubos de ensaio com tampas rosqueadas contendo solo estéril e estocados a -18 °C. Os conídios foram ativados em duas etapas, usando um meio básico conforme COURI (1993), composto por pectina cítrica (10 g/L), NaNO₃ (3 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), FeSO₄7H₂O (0,01 g/L) e Agar-agar (20 g/L), sendo transferidos do solo para este meio com alça de platina e incubados por cinco dias em estufa a 30 °C. Este foi denominado de primeiro repique. Partindo deste repique, foi obtido o segundo repique. Os esporos do segundo repique foram utilizados para obtenção de grande quantidade de esporos no meio de sabugo de milho. Cada repique pôde ser mantido sob refrigeração por um período de quatro meses e seguindo este procedimento cada suspensão de conídios no solo somente pôde ser usada 4 ou 5 vezes, e depois descartada.

Nos frascos de sabugo com esporos foram adicionados 40 mL de solução 0,3% v/v de Tween. Após agitação os esporos foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido.

3.6 Processo fermentativo

As fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato úmido. A umidade inicial do meio foi ajustada em 40, 50 e 60%, pela adição de um volume definido de água, que foi determinado pela Equação 3.7.

A suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio foi realizada adicionando sulfato de amônio. No volume de água a ser adicionado ao resíduo, diluiu-se o sulfato de amônio, obtendo-se as concentrações a serem estudadas no planejamento.

Os erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze e autoclavados por 5 minutos a 0,5 atm. Para realização das fermentações, o meio contido nos erlenmeyers foi inoculado com o microrganismo na concentração de 10^7 esporos/g de resíduo úmido e incubados em estufa úmida a 30 °C, sendo esta a temperatura média anual da região e também favorável ao desenvolvimento do microrganismo. A umidade relativa dentro da estufa durante o processo fermentativo foi mantida pela evaporação da água contida em um recipiente colocado dentro da estufa. Durante o processo, o nível da água era restabelecido e a umidade relativa permaneceu em torno de 60%. As amostras foram retiradas periodicamente durante o processo (0, 7, 22, 30, 44, 50, 66, 72 horas de fermentação), determinando-se a umidade, açúcares redutores, pH segundo os métodos descritos neste capítulo.

3.7 Extração das enzimas

O procedimento para a extração do extrato enzimático foi baseado no realizado por CASTILHO (1997). Para cada tempo de fermentação, após retirar as amostras para as análises, foi adicionado em cada erlenmeyer 5 mL/grama de meio fermentado de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5. Após homogeneização, os erlenmeyers foram deixados por 1 hora em banho termostático a 30 °C. Decidiu-se trabalhar com um tempo de contato maior que o utilizado por CASTILHO (1997), já que foram utilizados sistemas sem agitação. O extrato bruto obtido foi filtrado em algodão, centrifugado a 3000 rpm em centrífuga por 5 minutos. O extrato enzimático foi armazenado em tubos de ensaios e congelado em freezer para posterior medida da atividade enzimática.

3.8 Atividade enzimática

3.8.1 Atividade pectinolítica

A atividade pectinolítica do extrato enzimático foi dosada pelo método viscosimétrico, conforme COURI & FARIAS (1995). Em tubos de ensaio contendo 10 mL de pectina cítrica (Vetec) 1% m/v preparada em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,5, adicionou-se volumes variáveis do extrato, prosseguindo a reação a 35 °C por 10 minutos. Completado este tempo, ainda à mesma temperatura, mediu-se a viscosidade da mistura reacional em viscosímetro Cannon-Fensk modelo 52013. Foram também realizados ensaios em branco, nos quais volumes de tampão acetato 200 mM pH 4,5 foram adicionados à solução de pectina, iguais aos volumes utilizados com o extrato enzimático. Com os valores da viscosidade do ensaio em branco e daquele com extrato enzimático, calculou-se a redução percentual de viscosidade devida à ação enzimática, verificando qual volume utilizado correspondia a 50% de redução, de acordo com a Equação 3.8.

$$\% \text{ redução de viscosidade} = \frac{V_{Br} - V_R}{V_{Br}} \cdot 100 \quad (3.8)$$

Em que:

□_{Br} – viscosidade cinemática da solução de pectina sem o extrato enzimático (mm²/s)

□_R – viscosidade cinemática da solução de pectina com o extrato enzimático (mm²/s)

Assim, uma unidade de atividade pectinolítica foi definida como o inverso do volume (mL) de enzima que reduz em 50% a viscosidade de 10 mL de uma solução de pectina 1%, após 10 minutos de reação a 35 °C, calculada a partir da Equação 3.9.

$$\text{atividade pectinolítica} \left(\frac{U}{\text{g de meio fermentado}} \right) = \frac{1}{V_{50\%}} \cdot 5 \quad (3.9)$$

Onde:

5 – é a razão de tampão acetato adicionada durante a extração das enzimas, em mL/g de meio fermentado

3.8.2 Atividade poligalacturonásica

A medida da atividade poligalacturonásica foi determinada conforme COURI (1993) adaptado por Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza/CE. Em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução de ácido galacturônico 0,25% m/v, preparado em tampão acetato 200 mM pH 4,5, previamente aclimatado em banho termostático a 35 °C, adicionou-se 0,25 mL do extrato enzimático, seguindo a reação por 30 minutos a 35 °C. Após os 30 minutos, transferiu-se a 0,25 mL da mistura reacional para tubos contendo 1 mL do reagente DNS. Foi adicionada 0,75 mL de água destilada aos tubos, e em seguida foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos. Depois de resfriados a temperatura ambiente, foram adicionados um volume de 8 mL de água destilada aos tubos, e após homogeneização, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os ensaios foram realizados em duplicata, assim como os ensaios em branco, que são preparados segundo o mesmo procedimento acima, no entanto, o extrato enzimático é adicionado à solução de ácido poligacturônico e imediatamente transferido para os tubos contendo o DNS.

Uma unidade de atividade poligalacturonásica corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação, nas condições do ensaio (Equação 3.10).

$$\text{atividade de PG} \left(\frac{U}{g \text{ de meio fermentado}} \right) = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \cdot 17 \cdot 4 \cdot f}{192 \cdot 30} \cdot 5 \quad (3.10)$$

Onde:

$ABS_{amostra}$ – Absorbância da amostra

ABS_{branco} – Absorbância do branco

f – Fator de conversão da curva padrão de ácido galacturônico (mg/L)

17 – Diluição da enzima no meio reacional

4 – Diluição dos grupos redutores no reagente DNS

- 192 – Peso molecular do ácido galacturônico (g/mol)
30 – Tempo de reação (min)
5 – é a razão de tampão acetato adicionada durante a extração das enzimas, em mL/g de meio fermentado

3.9 Estudo da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH da enzima poligalacturonase do extrato enzimático bruto

Nesta etapa do trabalho estudou-se a estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH da enzima poligalacturonase contida no extrato enzimático bruto. Para tal finalidade foi utilizada uma metodologia baseada na descrita por ZHENG & SHETTY (2000).

Definida a condição de maior produção da PG, foi realizada uma nova fermentação seguindo o mesmo procedimento do item 3.6 deste capítulo. Para o estudo de termoestabilidade o extrato enzimático obtido, após ser extraído de acordo com o item 3.7, foi incubado em temperaturas de 10 a 90 °C, em intervalos de 10 °C, por 20 minutos e em seguida realizada a medida da atividade poligalacturonásica segundo item 3.8.2. Quanto ao estudo relacionado ao pH, a fermentação ocorreu nas mesmas condições da termoestabilidade, no entanto a extração da enzima foi realizada com os seguintes tampões: 0,1 M glicina-HCl para pH 2,5; tampão acetato 200 mM para pH 3,5-6,5; 0,1 M Tris-HCl para pH 7,5 – 8,5 e para a faixa de pH 9,5 – 10,5 utilizou-se 0,1 M glicina-NaOH. Após a extração, a enzima bruta foi congelada e armazenada por 24 horas e então foi determinada a atividade poligalacturonásica do mesmo modo que nos ensaios para estabilidade térmica. Os resultados foram expressos em termos da atividade residual (%), a partir da Equação 3.11, determinada a partir da atividade máxima obtida nas condições padrão, de acordo com item 3.8.2 deste capítulo.

$$atividade\ residual = \frac{atividade_R}{atividade_{padr\tilde{a}o}} \quad (3.11)$$

Onde:

$atividade_R$ - valor da atividade de PG obtida após passar pelos processos de incubação nas temperaturas e valores de pH definidos no estudo de estabilidade

*atividade*_{padrão} – valor da atividade máxima de PG determinada nas condições padrão de temperatura (35 °C) e pH (4,5)

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização

4.1.1 Avaliação do percentual da casca e albedo dos frutos do maracujá para obtenção do resíduo

Na Tabela 4.1 são apresentadas as relações em peso do maracujá inteiro, da casca e albedo antes e após secagem, bem como, da polpa da fruta. É possível observar que os frutos do maracujá constituíram-se de 61,40% de casca e albedo, e 38,60% de polpa mostrando que a maior porcentagem é resíduo, sendo na maioria das vezes, desperdiçado. Estes valores se aproximam do percentual encontrado por OLIVEIRA (2007), que foram de 63,32% para a casca e 36,68% para a polpa.

Tabela 4.1 – Percentual de polpa, casca e albedo (*in natura* e seco) do maracujá

Quantidade de maracujá	Inteiro (kg)	Casca + albedo (kg)	Polpa (kg)	Casca + albedo: seco e moído (kg)
20	2,685	1,680	1,005	0,401
18	2,335	1,565	0,770	0,173
15	2,050	1,305	0,745	0,255
14	1,790	1,155	0,635	0,326
13	1,700	1,090	0,610	
13	1,680	1,150	0,530	
25	2,515	1,230	1,285	
23	2,345	1,325	1,020	
TOTAL	141	17,100	6,600	1,155
Percentual do peso total (%)		61,400	38,600	6,750

4.1.2 Caracterização do resíduo seco do maracujá

A caracterização do resíduo seco obtido após o despulpamento, secagem e moagem da casca e albedo do maracujá está apresentada na Tabela 4.2. As análises foram realizadas em triplicata, com exceção da densidade real e porosidade que foram realizadas apenas em um ensaio. Na Figura 4.1 pode-se visualizar o aspecto do resíduo obtido.

Tabela 4.2 – Valores médios e desvios padrão dos parâmetros físico-químicos do resíduo do maracujá em base seca

Parâmetros analisados	Valor
Umidade	0,150 ± 0,014
Cinzas (%)	6,330 ± 0,180
Proteína total (%)	5,720 ± 0,343
Pectina (% pectato de cálcio)	13,100 ± 0,141
ART* (%)	20,800 ± 1,021
AR** (%)	11,710 ± 0,461
°Brix	22,500 ± 0,635
Densidade aparente (g/cm ³)	0,401 ± 0,006
Densidade real (g/cm ³)	1,250
Porosidade	0,680
pH	3,570 ± 0,200

*ART - açúcares redutores totais; ** AR - açúcares redutores



Figura 4.1 – Aspecto visual do resíduo seco do maracujá

A umidade obtida com a secagem (15,00%) está acima do valor encontrado por ABUD et al. (2007), que foi de 8,85%.

O teor de cinzas de 6,33% determinado para este resíduo foi próximo ao encontrado por MATSUURA (2005), quando este pesquisador caracterizou o albedo do maracujá amarelo e verificou ser 7,70% o teor de cinzas.

Com um teor de 5,72% de proteína total, o resíduo do maracujá encontra-se com um valor abaixo de alguns resíduos utilizados em FSS como o farelo de arroz (FAWOLE & ODUNFA, 2003), que possui 13,12% de proteína bruta e farelo de trigo (CASTILHO, 1997), que apresenta uma quantidade ainda maior de proteína (16%), composição segundo RODRIGUES FILHO & CAMARÃO (2005). No entanto, resíduos de algumas frutas como mangaba, goiaba, acerola e umbu, que estão sendo estudados recentemente para produção dessas enzimas, apresentam um teor de proteína bem inferior ao do resíduo do maracujá, sendo de 0,64%; 0,58%; 0,52% e 0,43%, respectivamente, tendo sido determinados por ABUD et al. (2007).

O resíduo apresentou um teor de pectina igual a 13,10 expresso em % de pectato de cálcio. DARTORA et al. (1999), estudando diversos fungos filamentosos, inclusive *Aspergillus niger* na produção de pectinases, utilizando farelo de trigo como principal fonte de carbono, observou que adicionando-se pectina na concentração de 10% (m/m) tem-se o valor ótimo para que se perceba um efeito de indução sobre a produção da enzima. FONTANA et al. (2005), produzindo PG por *Aspergillus niger*, em um meio a base de farelo de trigo, encontraram que até 16% a pectina pode ser adicionada sem que seja observado um efeito de repressão por parte deste componente na excreção das pectinases pelo fungo produtor.

O valor de ART encontrado para este resíduo de 20,8%, foi superior a 9,68% obtido por ABUD et al. (2007). A determinação do °Brix, forneceu um valor de 22,5 para este parâmetro, próximo ao valor de 17,5 para o resíduo seco do pedúnculo de caju determinado por SANTOS (2007).

O teor de AR apresentado pelo resíduo seco foi de 11,71%. A literatura mostra que altas concentrações de açúcares no meio suprem a necessidade dos microrganismos para seu crescimento e a pectina no meio é pouco utilizada. Porém quando a concentração de açúcar é baixa, há a quebra da molécula de pectina, de modo que possa ser consumida, levando a altas atividades pectinolíticas (FAWOLE & ODUNFA, 2003). FONTANA et al. (2005) produzindo PG por *Aspergillus niger*, em um meio a base de farelo de trigo, afirmaram que altas concentrações de glicose, acima de 10% (m/m), exercem efeito inibitório sobre a atividade enzimática, mas que altos rendimentos em enzimas são obtidos em meios que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina. Apesar do valor de AR (11,71%) encontrado para o resíduo estar acima do recomendado por esta pesquisadora, concorda com a segunda afirmativa de que meios contendo quantidades balanceadas de açúcares e pectina são propícios para produção

dessas enzimas. Este valor também excede o determinado por BOTELLA et al. (2007), que verificaram ser de 8% (m/m) a concentração de glicose responsável por causar efeito de inibição na produção de xilanase e exo-PG, quando utilizaram polpa de uva e como agente da fermentação *Aspergillus awamori*.

O resíduo seco apresentou pH ácido ($3,57 \pm 0,20$), possuindo as condições de pH adequadas para a adaptação do microrganismo ao meio. ZHENG & SHETTY (2000), determinaram que o pH igual a 5, foi considerado como ótimo para produção de PG por *Lentinus edodes*.

A distribuição granulométrica para o resíduo seco pode ser visualizada na Figura 4.2. Pode-se observar que a maioria das partículas possui tamanho entre 20 e 35 mesh, o que corresponde a partículas entre 0,42 e 0,85 mm. BOTELLA et al. (2007) realizaram estudos com partículas de 0,06 a 1,00 mm, 0,74 mm e 1,00 a 1,60 mm, para produção de xilanase e pectinase, mas não verificaram efeito significativo desse tamanho de partículas na produção de ambas as enzimas. No entanto, sabe-se que partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiano, mas ao mesmo tempo, tendem a compactar-se facilmente, comprometendo a respiração e aeração do sistema. Partículas maiores quando distribuídas nos reatores para a realização da FSS, por sua vez, promovem mais espaço interpartículas, porém diminuindo o rendimento da absorção dos nutrientes pelo microrganismo. Segundo PINTO et al. (2006), o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano atravesse os espaços vazios do meio. Cerca de 10% das partículas apresentaram tamanho menor que 0,25 mm, influenciando na alta porosidade (0,68) encontrada, favorecendo a aeração do sistema, e disponibilizando o oxigênio necessário ao desenvolvimento do microrganismo. Além do tamanho das partículas, a porosidade está relacionada com a densidade real, que para este resíduo o valor encontrado foi de $1,25 \text{ g/cm}^3$. A densidade aparente ($0,401 \text{ g/cm}^3$) também representa um fator importante ao desenvolvimento do microrganismo, e revela que o resíduo tende a não se compactar completamente, gerando os espaços vazios entre as partículas do resíduo, suficientes para respiração e metabolismo.

Foram realizadas análises de atividade poligalacturonásica no resíduo seco, porém nenhuma atividade desta enzima foi detectada.

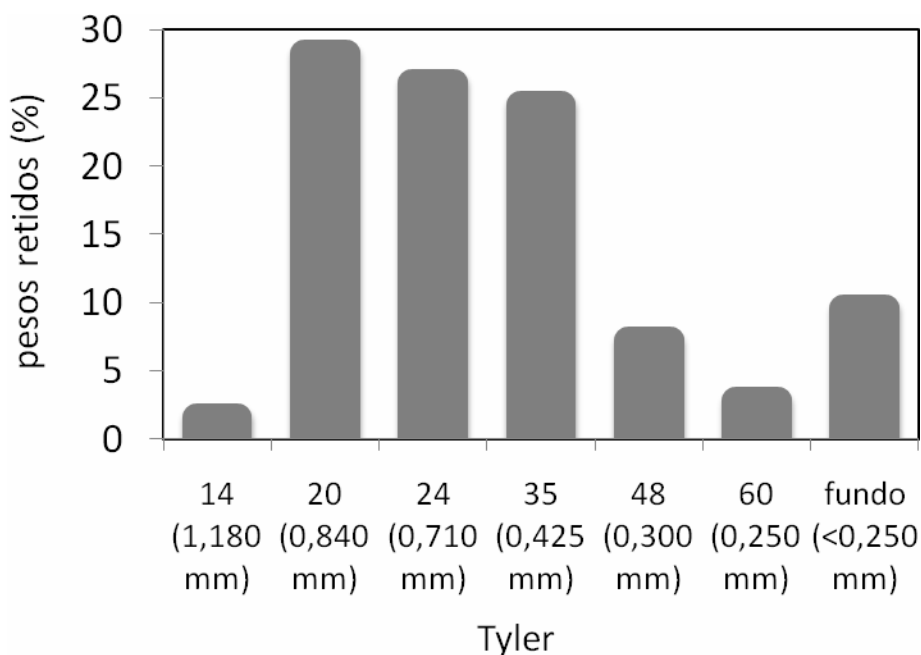


Figura 4.2 – Distribuição granulométrica do resíduo seco do maracujá

4.1.3 Atividade de água

Foram construídas isotermas de adsorção de umidade do resíduo seco nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C. Através dos dados obtidos pode-se caracterizar o resíduo seco predizendo, por exemplo: o teor de água livre contido nesse substrato após o processo de secagem (pré-tratamento); a faixa de atividade de água na qual esse resíduo pode ficar armazenado sem que haja ações deteriorativas por microrganismos, como também determinar a faixa de atividade de água em que o fungo pode se desenvolver.

4.1.3.1 Modelagem das isotermas de adsorção de umidade

Na Tabela 4.3, encontram-se os valores das atividades de água (a_w) e das umidades de equilíbrio (XE) para as diferentes temperaturas estudadas. É possível observar que as umidades de equilíbrio do resíduo seco aumentam com o aumento da atividade de água.

Tabela 4.3 – Valores experimentais da umidade de equilíbrio (XE) em função da atividade de água (a_w), nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C

Temperatura (°C)							
25		30		35		40	
a_w	XE (b.s.)	a_w	XE (b.s.)	a_w	XE (b.s.)	a_w	XE (b.s.)
0	0	0	0	0	0	0	0
0,505	0,121	0,509	0,121	0,531	0,124	0,528	0,124
0,603	0,137	0,623	0,137	0,635	0,138	0,640	0,138
0,692	0,191	0,717	0,191	0,704	0,164	0,706	0,164
0,754	0,263	0,784	0,263	0,770	0,225	0,774	0,225
0,829	0,352	0,844	0,352	0,855	0,336	0,859	0,336
0,86	0,446	0,876	0,446	0,895	0,459	0,901	0,459
0,876	0,562	0,906	0,562	0,924	0,554	0,933	0,554
0,903	0,644	0,922	0,644	-	-	-	-
0,931	0,789	-	-	-	-	-	-

Com auxílio do Software Statistica 5.0, foi realizada a modelagem das isotermas utilizando o modelo de GAB. As isotermas de adsorção de umidade a 25, 30, 35 e 40 °C do resíduo seco do maracujá com os respectivos valores de umidade de equilíbrio (XE) e diferentes atividades de água (a_w) estão representadas na Figura 4.3, assim como o ajuste feito pelo modelo de GAB.

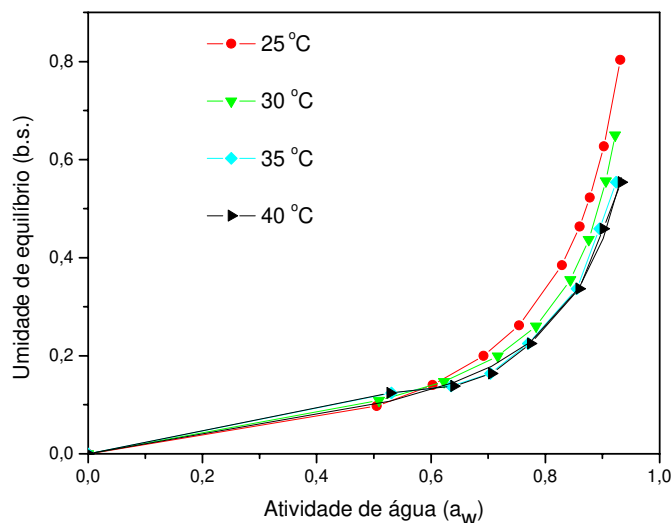


Figura 4.3 – Ajuste das isotermas de adsorção de umidade do resíduo seco do maracujá pelo modelo de GAB, nas temperaturas estudadas

É possível notar que em 35 e 40 °C, as isotermas quase se sobrepõem, indicando que há pouca influência da temperatura neste caso. O efeito desta variável é maior no intervalo entre 25 – 30 °C em atividade de água acima de 0,8. O material a 25 °C mostrou-se ser mais higroscópico, adsorvendo uma maior quantidade de água.

Na Tabela 4.4 têm-se os valores dos parâmetros do modelo de GAB, ajustado às isotermas de adsorção de umidade do resíduo seco do maracujá, os coeficientes de determinação (R^2) e os desvios percentuais médios (P), nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C. Por meio da Figura 4.3, observa-se que as curvas são do tipo III de acordo com a classificação de BRUNAUER et al. (1938) e conforme BLAHOVEC (2004), classificam-se como do tipo II, já que o valor da constante K encontra-se entre 0 (zero) e 1 (um), e o valor da constante C é maior do que 2 (dois), conforme Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Parâmetros de ajuste do modelo de GAB, coeficientes de determinação (R^2) e os desvios percentuais médios (P), para as temperaturas estudadas

Temperatura (°C)	Parâmetro			R^2	P (%)
	X_M	C	K		
25	0,098	1,119	0,955	0,996	5,75
30	0,063	6,507	0,981	0,999	3,28
35	0,059	8,876	0,969	0,998	4,40
40	0,064	4,856	0,952	0,997	5,10

De acordo com o R^2 e o P, o modelo testado se ajusta de forma adequada aos dados experimentais. O valor de P inferior a 10% e R^2 próximo a unidade indica um bom ajuste (LOMAURO et al., 1985).

No APÊNDICE I, Tabela I.1, encontram-se os valores experimentais e teóricos da umidade de equilíbrio do resíduo seco do maracujá, e os erros relativos.

Em relação aos valores encontrados da umidade na monocamada (X_M), observa-se uma diminuição entre as temperaturas de 25 e 30 °C. Entre 30 – 40°C percebe-se que os valores praticamente são iguais. Os valores de X_M variaram entre 5,9 e 9,8% (base seca), esta é a faixa de umidade para uma armazenagem segura, nas temperaturas estudadas. De acordo com dados da literatura, a atividade de água de 0,77 corresponde ao valor mínimo para que o fungo *Aspergillus niger* desenvolva suas atividades metabólicas, portanto, é necessário que em uma FSS utilizando-se este substrato e microrganismo, a umidade esteja acima dos já citados anteriormente.

Quanto ao parâmetro K do modelo de GAB, observam-se valores menores que um (1), variando entre 0,952 e 0,981. Em relação a constante de sorção C, que é função das interações entre os sítios ativos do produto e as moléculas de água, observa-se que os valores foram bem inferiores a 200, estando dentro da faixa comumente encontrada na literatura (ALEXANDRE et al., 2007).

Por meio da aplicação do modelo de GAB apresentado no item 3.3 do Capítulo 3 e os parâmetros encontrados desse modelo (X_M , K e C), pôde-se determinar os valores de atividade de água correspondentes as outras condições de umidade (50 e 60%) do planejamento, e estão mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Atividade de água encontrada pelo ajuste do modelo de GAB para as umidades de 50 e 60%

Umidade (% b.u)	Temperatura (°C)	Atividade de água (a_w)
50	25	0,953
	30	0,956
	35	0,972
	40	0,985
60	25	0,983
	30	0,977
	35	0,991
	40	1,000

4.1.3.2 Restabelecimento da umidade no meio para posterior fermentação

De forma a restabelecer a umidade no substrato para o desenvolvimento microbiano durante a fermentação, foram construídas curvas correlacionando as variáveis: volume de água adicionado ao resíduo, umidade (base úmida) e atividade de água. Todo este estudo foi realizado a 30 °C, sendo esta a temperatura definida para a fermentação, por ser favorável ao desenvolvimento do microrganismo. A 40 °C, por meio de testes preliminares, verificou-se que não havia crescimento do fungo.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram a relação entre o volume de água adicionado a 5 g do resíduo seco, a umidade e a atividade de água (a_w) do resíduo para a temperatura de

30 °C. A atividade de água inicial no material nesta temperatura foi de $a_w = 0,509$ e a umidade (b.u.) de quase 15%. A cada adição de água promoveram-se aumentos graduais nos valores de umidade e atividade de água (a_w).

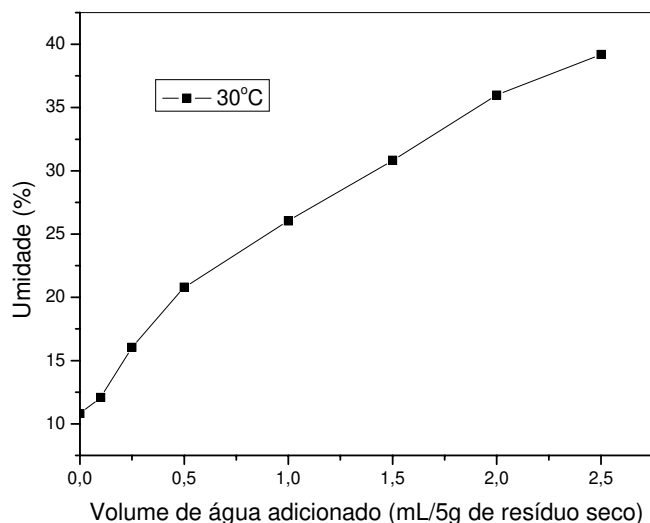


Figura 4.4 – Relação entre a umidade (b.u.) e o volume de água adicionado (mL), para a temperatura de 30 °C

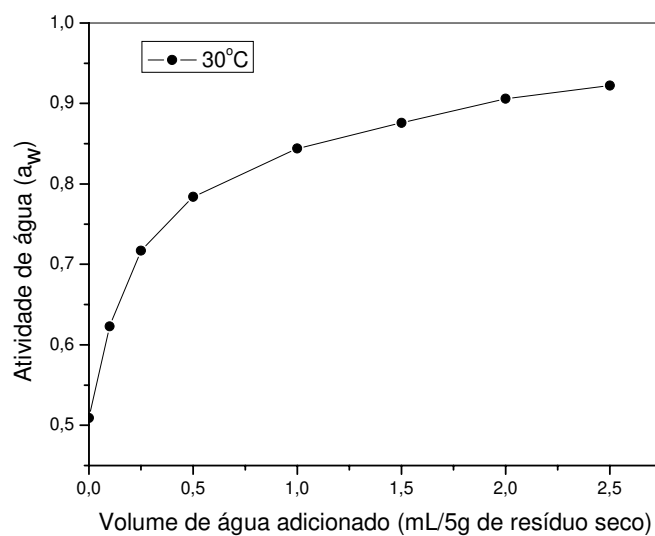


Figura 4.5 – Relação entre a atividade de água e o volume de água adicionado (mL), para a temperatura de 30 °C

Com auxílio destas curvas foi possível ajustar o valor de umidade inicial do resíduo pela adição de uma quantidade definida de água.

4.2 Processo fermentativo

As Figuras 4.6a, 4.6b e 4.6c, mostram o processo em 44 horas de fermentação para as condições dos ensaios 3, 5 e 2, respectivamente, nos quais os conteúdos de umidade foram de 40, 50 e 60%, respectivamente, e para a concentração de nitrogênio os valores foram de 2,0, 1,5 e 1,0%. Pode-se visualizar que na condição do ensaio 2, houve um maior favorecimento ao crescimento do fungo, provavelmente pela maior atividade de água presente neste experimento.

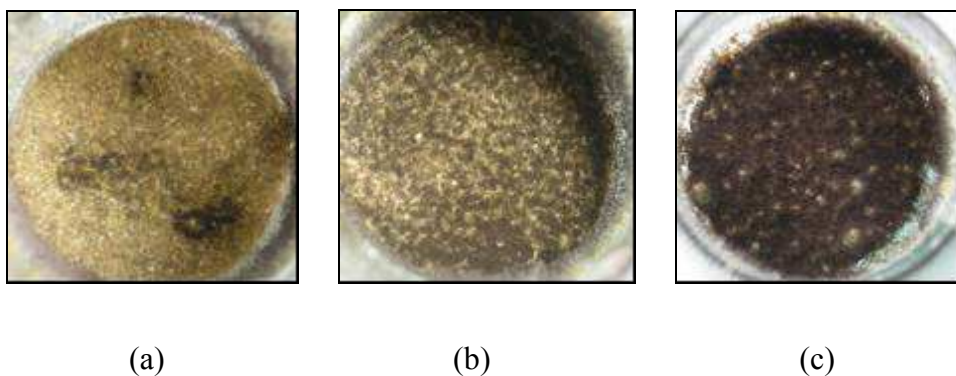


Figura 4.6 – Processo semi-sólido em 44 de horas de fermentação para as condições dos ensaios 3 (a), 5 (b) e 2 (c)

Durante a fermentação, foram retiradas amostras periodicamente, incluindo o tempo inicial do processo obtido no instante seguinte à inoculação do microrganismo, para realizar análises de pH, umidade, AR, atividade pectinolítica e poligalacturonásica, segundo as metodologias descritas no Capítulo 3. As Figuras 4.7 a 4.12 apresentam a o comportamento destas variáveis com o tempo analisadas para cada ensaio realizado.

O ensaio 1 teve como condições iniciais 40% de umidade e 1,0% de nitrogênio e o comportamento das variáveis analisadas está ilustrado na Figura 4.7.

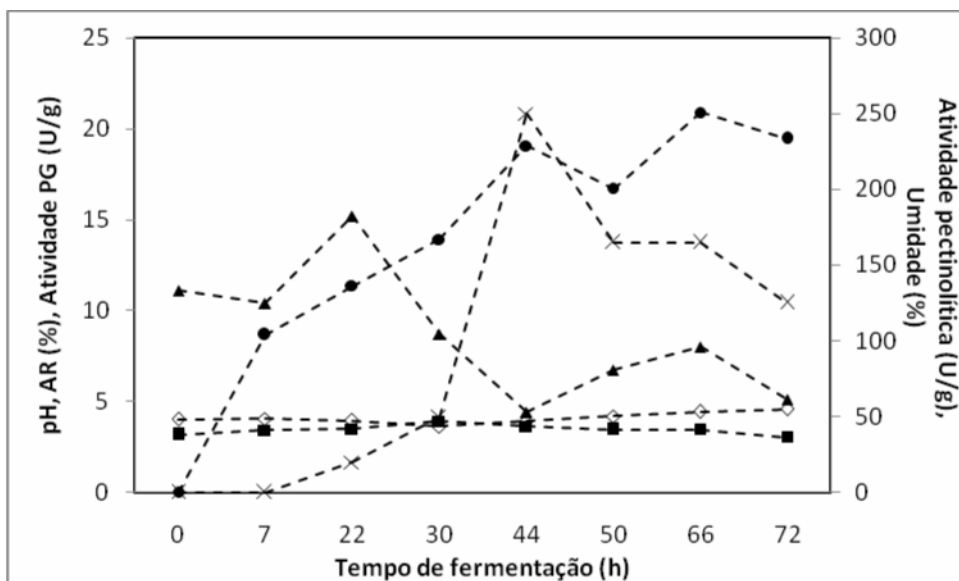


Figura 4.7 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 1 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

O pH apresenta-se constante durante as 72 horas de fermentação. O pH ácido é considerado como ótimo por alguns autores para produção de pectinases. DANIEL & TRINDADE (1996), verificaram que o pH inicial deveria estar entre 2,75 e 3,00 para obter bons rendimentos com enzimas pectinolíticas utilizando cascas de limão como meio-sólido, enquanto que FAWOLE & ODUNFA (2003) encontraram pH em torno de 5 para produção de poligalacturonase e pectinaesterase para farelo de arroz como substrato, nos dois casos o microrganismo utilizado foi uma linhagem do *Aspergillus niger*. Segundo ZHENG & SHETTY (2000), estudando a produção de PG por *L. edodes*, verificaram que estas enzimas podem ser utilizadas nos processos de extração e clarificação de sucos, sem sofrer perda considerável da sua atividade, já que o pH natural de frutas, tecidos vegetais e sucos é ácido.

Assim como o pH, a umidade não sofreu praticamente variações.

No início do processo (0 a 7 horas de fermentação), o teor de AR estava em torno de 11%, demonstrando que até 7 horas pôde-se perceber as fases de adaptação do microrganismo ao meio, uma vez que, o AR permanece praticamente constante. Após as 7 até 22 horas, observa-se através do comportamento da curva que houve um acúmulo de açúcares redutores no meio de cultivo. Neste caso, pode ser que a velocidade de hidrólise de outros carboidratos, por exemplo a pectina, seja maior que a velocidade de consumo de açúcares redutores por parte dos microrganismos, já que este encontrou um

ambiente menos favorável ao seu desenvolvimento (condição de menor atividade de água estudada no processo), levando a hidrólise e conseqüentemente dispor no meio, açúcares mais fáceis de serem metabolizados. Na análise do tempo inicial do processo, a PG não foi detectada, a produção desta enzima começa a partir de 7 horas de fermentação. Conforme TRINDADE et al. (1996), o microrganismo tende a hidrolisar primeiramente as substâncias pécticas pouco metoxiladas, e segundo MATSUURA (2005), a pectina presente no maracujá apresenta baixo conteúdo metoxílico, o que funcionaria como um indutor para a produção de PG. Verifica-se a partir das 22 horas uma acentuada queda na curva de AR, chegando a aproximadamente 5%, na 44^a hora. Neste mesmo instante, a atividade pectinolítica é máxima. Segundo FAWOLE & ODUNFA (2003), concentrações altas de glicose no meio provavelmente satisfazem a exigência de crescimento do microrganismo e a quebra da pectina é desnecessária ou mínima e assim é observada uma baixa atividade enzimática nessas culturas. Contudo, com baixas concentrações de glicose, surge à necessidade da quebra da pectina em formas que podem ser metabolizadas pelos microrganismos e dessa forma a atividade aumenta, o que acontece no presente caso. PANDEY et al. (1999) afirmaram que a presença de pectina no meio, além do efeito indutivo, favorece a excreção de pectinases pelos fungos produtores. No tempo de 50 horas de cultivo, novamente ocorre um acúmulo na concentração de AR no meio, possivelmente pela necessidade de continuar sobrevivendo, o microrganismo hidrolisa outros carboidratos, sendo esta velocidade de hidrólise novamente maior que a de consumo de AR contida no meio. Simultaneamente a esta situação, verifica-se a produção de PG, assim como das outras pectinases. A atividade pectinolítica atinge um pico de 250 U/g em 44 horas de fermentação, enquanto que a atividade de PG (20,9 U/g) é máxima em 66 horas de fermentação. SANTOS (2007) trabalhando nas mesmas condições, mas com pedúnculo de caju como substrato, conseguiu obter aproximadamente 16 U/g de atividade de PG.

Na Figura 4.8, tem-se a representação gráfica para o ensaio 2 (60% de umidade e 1,0% de nitrogênio).

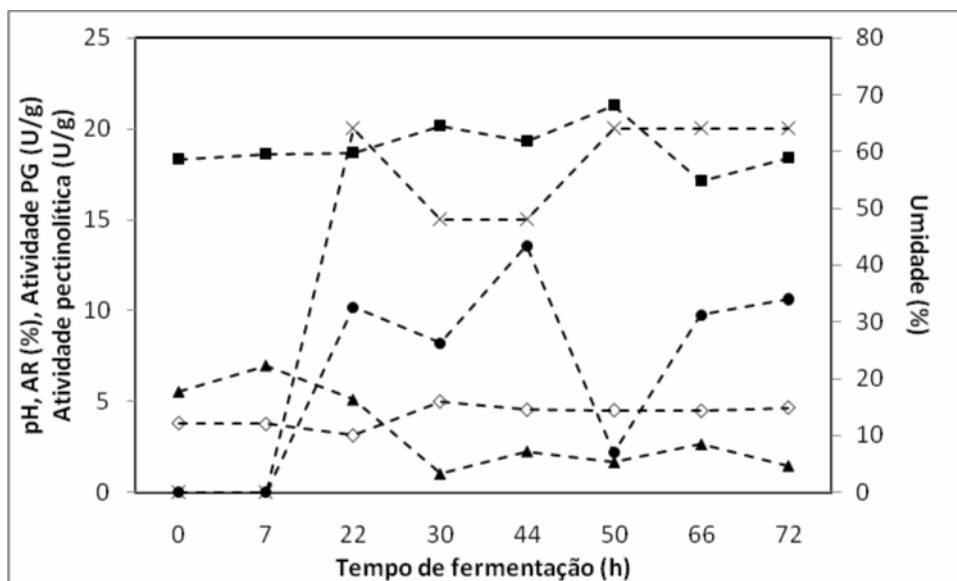


Figura 4.8 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 2 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

Observando o perfil de pH, percebe-se que com 22 horas de fermentação, o pH diminuiu, passando de 3,80 para 3,13. BOTELLA et al. (2007) trabalhando com polpa de uva e *Aspergillus awamori* para produção de pectinases e xilanases, observaram o mesmo fato associando o decréscimo de pH, a produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos no início da fermentação. Quando a concentração de açúcares diminui, o que acontece aproximadamente entre 7 e 30 horas do processo, o pH volta a aumentar provavelmente pela assimilação dos ácido orgânicos por ação microbiana. SANTOS (2007) estudando a produção de pectinases, utilizando pedúnculo de caju como meio sólido e *Aspergillus niger* também observou o mesmo fenômeno.

Entre 0 e 7 horas de processo, não houve grande variação na curva de AR, bem como não foi detectada atividade enzimática, provavelmente pelo fato do fungo estar se adaptando ao meio. Em 22 horas de fermentação, verifica-se o início da queda na curva de AR, começa também a produção das pectinases, inclusive da poligalacturonase. A partir da 30ª hora até o fim deste processo, não se percebe grande variação na curva de AR, no entanto parece que o microrganismo está utilizando a pectina como fonte de carbono e assim produzindo as pectinases. A atividade de PG para este experimento foi de 13,55 U/g. PINTO et al. (2005) produzindo poligalacturonase com casca de maracujá triturada, encontraram que a maior produção foi de 21,85 U/g com umidade entre 53 e 62%.

Há uma diminuição da umidade de 68% para 55% entre 50 e 66 horas de cultivo.

Na Figura 4.9, é mostrada o ensaio 3, que teve como condições 40% de umidade e 2,0% de nitrogênio.

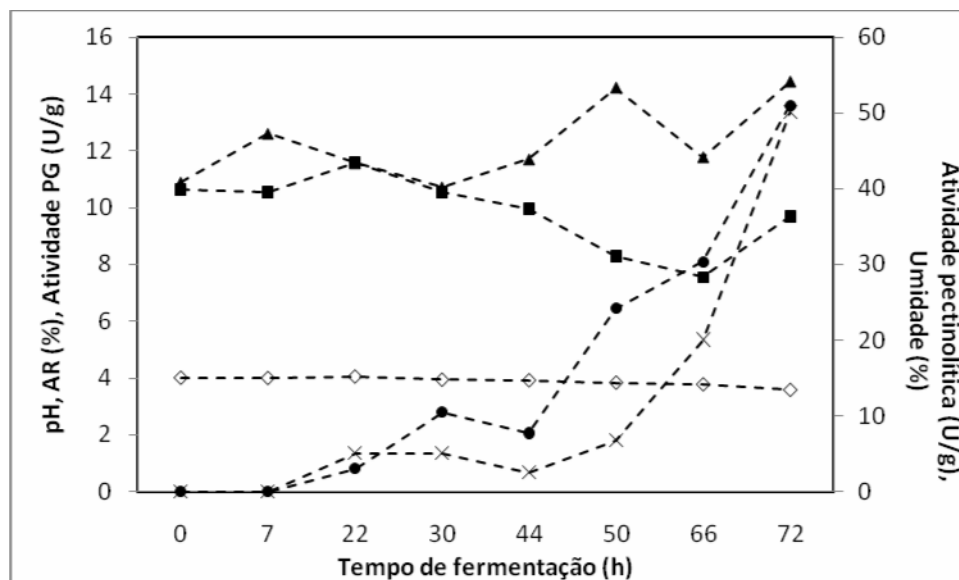


Figura 4.9 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 3 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

O comportamento para a curva do pH foi semelhante a obtida no ensaio 1 (Figura 4.7), não havendo variações bruscas durante as 72 horas da fermentação.

O consumo de açúcar não foi muito evidenciado. O microrganismo parece passar por um período de adaptação maior que o observado nos ensaios anteriores, neste ensaio esse período ocorre entre aproximadamente 0 e 44 horas de processo fermentativo. O carboidrato não hidrolisado, conforme DARTORA et al. (1999) pode ser resultado do fato do crescimento do micélio se dar predominantemente na superfície do meio, com pequena penetração do mesmo. Portanto, segundo estes pesquisadores, o fungo não atinge as partes mais internas do meio. MITCHELL et al. (2000) ressaltam a importância das hifas penetrativas, podendo desempenhar um papel importante na disponibilidade do substrato, pois, na maioria das vezes, estes são polímeros insolúveis em água, que precisam ser degradados em frações monoméricas, solúveis em água, para serem, então, consumidos, portanto, esta degradação enzimática do substrato, pela fração penetrativa das hifas, é um fator determinante para o processo. A produção de PG não é muito significativa neste período. Nessas condições do ensaio 3 (Figura 4.9), a

concentração da fonte de nitrogênio foi o dobro da utilizada do ensaio 1 (Figura 4.7), possivelmente houve uma inibição no crescimento do microrganismo pelo sulfato de amônio.

O conteúdo de umidade cai entre 44 e 66 horas, em relação ao valor previsto na condição inicial do ensaio. As condições para o microrganismo são ainda mais adversas neste momento, e semelhantemente ao ensaio 1, observa-se um pico na curva de AR que pode ser associado a mesma causa, com a diferença de que neste ensaio o pico ocorre em 50 horas de fermentação. A perda de umidade pode estar relacionada à evaporação e às atividades metabólicas microbianas ocorridas durante o processo fermentativo (DEL BIANCHI et al., 2001), por isso é importante manter o nível de água do recipiente contido na estufa sempre igual durante toda a fermentação, para que a umidade relativa dentro da mesma não se altere, o que parece não ter acontecido nesse período do processo. Em 44 horas até o tempo de fermentação estudado, a produção das enzimas pelo fungo começa a aumentar.

A umidade inicial do ensaio 4 (Figura 4.10) é a mesma que no ensaio 2 (Figura 4.8), diferindo na concentração de nitrogênio que passou de 1,0% para 2,0%. A Figura 4.10 mostra o processo fermentativo deste cultivo.

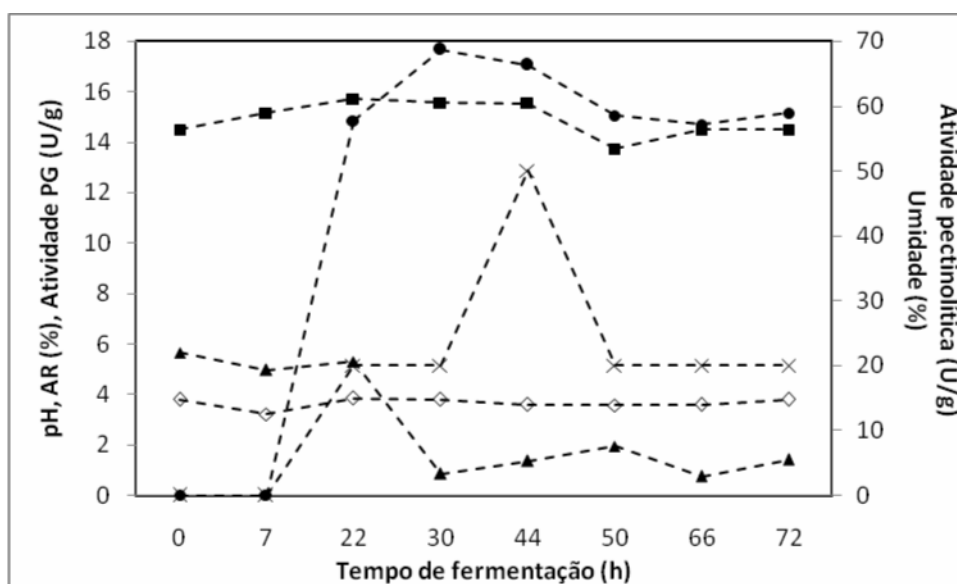


Figura 4.10 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 4 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

Houve uma queda no pH nas primeiras horas da fermentação (em 7 horas), passando de 3,80 para 3,21. Passada esta fase inicial, o pH volta a praticamente o mesmo valor (3,86), e depois atinge um patamar constante e em torno de 3,60. Para o perfil de AR, a partir de 22 horas houve uma redução até atingir valores próximos a zero, antes deste momento não se observou consumo significativo pelo microrganismo. Após este instante até as 72 horas de fermentação, o perfil de AR não se alterou muito. A poligalacturonase foi detectada, via análise, a partir de 22 horas de fermentação, assim como outras pectinases. A atividade pectinolítica é máxima (50 U/g) em 44 horas de fermentação, enquanto a atividade de PG alcança seu valor máximo (18 U/g) em 30 horas de processo.

A umidade no meio manteve-se praticamente constante até 50 horas de fermentação, quando pode-se observar uma queda (60 – 53%). Como já foi discutido anteriormente no ensaio 3, ao longo do processo fermentativo ocorre evaporação de água devido ao calor gerado pelas atividades metabólicas do microrganismo.

Neste ensaio a combinação da maior concentração da fonte de nitrogênio e maior umidade proporcionou um aumento na síntese das pectinases pelo microrganismo, pelo menos durante as 72 horas de fermentação estudadas, quando se compara ao ensaio 2, em que o conteúdo de umidade é menor.

Os pontos centrais são mostrados nas Figuras 4.11 a 4.13. Foram realizadas três réplicas com as condições de 50% de umidade e 1,5% de nitrogênio, com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade dos dados e checar a curvatura.

Em todos estes experimentos, o pH permaneceu constante e em torno de 4 (quatro). Os dados de AR mostram que para as três réplicas ocorreram um pico com 22 horas de fermentação, provavelmente como aconteceu no ensaio 1, devido ao acúmulo de açúcares redutores no meio. A atividade de PG é máxima (aproximadamente 20 U/g), em torno de 44 a 66 horas de cultivo. ZHENG & SHETTY (2000) encontraram atividade de 29,4 U/g e 20,1 U/g para bagaço de morango e maçã, respectivamente. Apesar do valor encontrado para a produção de PG ter sido inferior ao presente estudo, é importante salientar que estes autores utilizaram suplementação com ácido poligalacturônico (indutor de PG), o que aumenta o custo do processo, além destes valores terem sido obtidos após 40 dias de fermentação com o microrganismo *Lentinus edodes*.

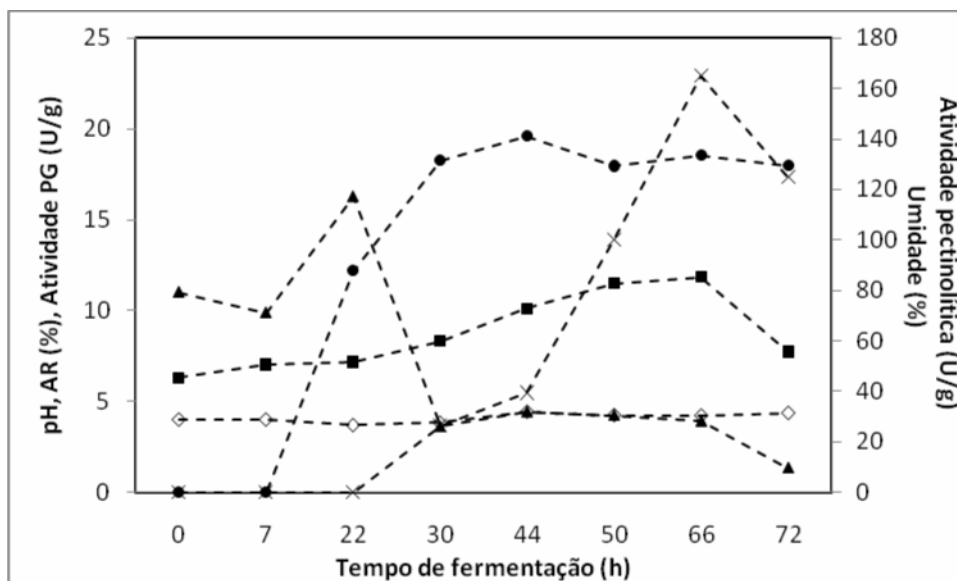


Figura 4.11 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 5 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

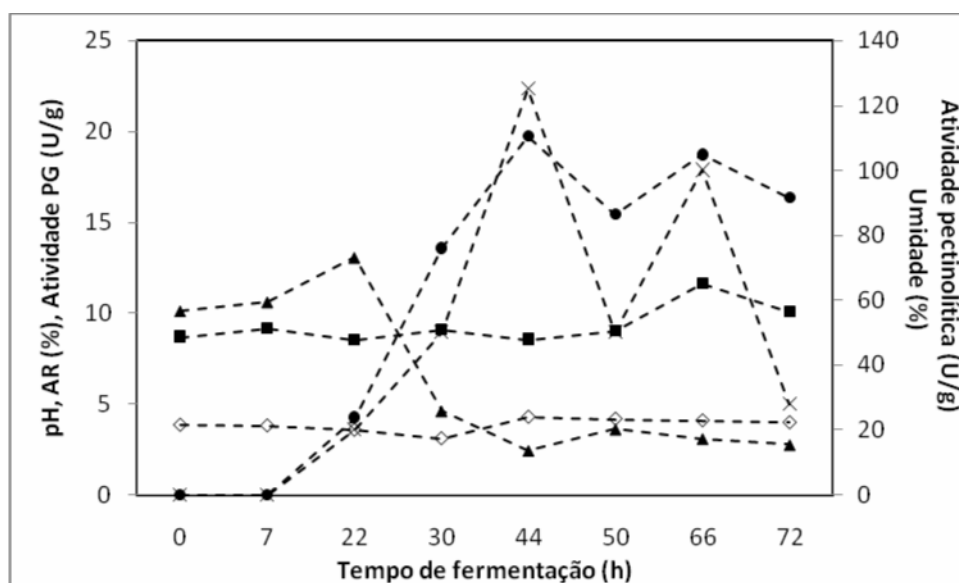


Figura 4.12 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo - Ensaio 6 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

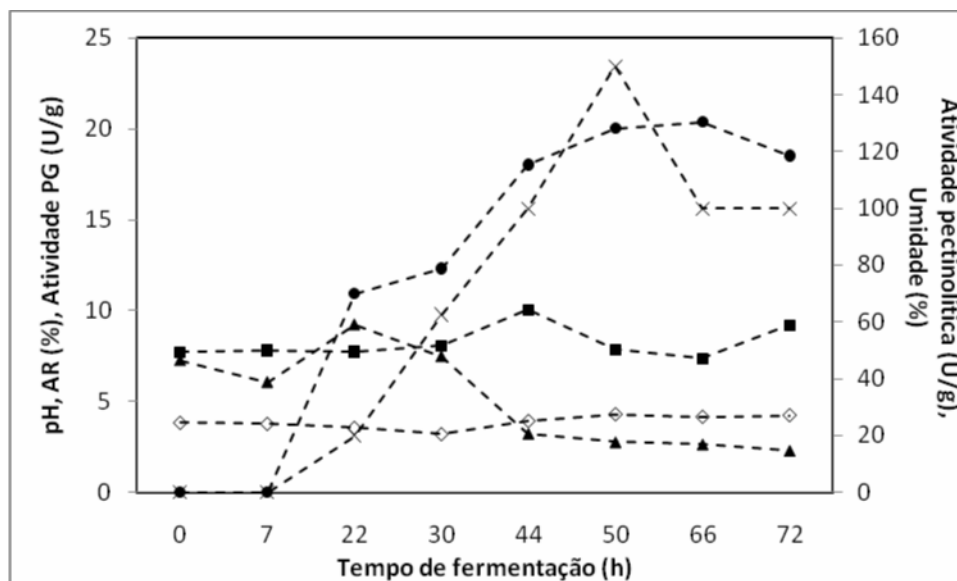


Figura 4.13 – Acompanhamento do processo de fermentação semi-sólida por *Aspergillus niger* do resíduo do maracujá no tempo – Ensaio 7 (■ Umidade (%), ▲ AR (%), ◇ pH, × Atividade pectinolítica (U/g), ● Atividade PG (U/g))

Pode-se considerar que visualmente houve uma reprodução satisfatória para todas as variáveis respostas estudadas, principalmente no que se refere ao comportamento similar das mesmas, exceto a medida de atividade pectinolítica. A reprodutibilidade nos dados de atividade pectinolítica não foi tão boa quanto a observada nos dados de PG. O procedimento de determinação dessa atividade pode gerar algumas falhas, já que é um método de tentativa e erro, onde é necessária a realização de várias medidas de redução de viscosidade, até que se obtenha o inverso do volume de enzima que proporciona 50% de redução. Com o objetivo de reduzir o número de ensaios que seria necessário para obter-se a redução de viscosidade exatamente igual a 50%, CASTILHO (1997) sugere que tendo para cada amostra pelo menos dois pontos, próximos de 50% de redução, de preferência um superior e outro inferior a este valor, é possível calcular a atividade pectinolítica viscosimétrica por interpolação.

4.3 Análise do processo fermentativo utilizando a metodologia de superfície de resposta

4.3.1 Avaliação das respostas utilizando os dados da cinética fermentativa

Por meio do planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, verificou-se a influência das duas variáveis de entrada (umidade inicial – U* e concentração de nitrogênio – N*) sobre os valores das respostas (atividade pectinolítica – AP e atividade de poligalacturonase - APG), nos intervalos de tempos analisados. Nas Tabelas 4.6 e 4.7, encontram-se os dados da cinética fermentativa utilizados nesse estudo. Os valores em destaque correspondem ao valor de maior atividade alcançado durante as 72 horas de fermentação para cada ensaio realizado.

Tabela 4.6 – Dados da atividade pectinolítica para cada ensaio e por tempo de fermentação

Atividade pectinolítica (U/g)							
Tempo de fermentação (h)	Ensaio						
	1	2	3	4	5	6	7
7	0	0	0	0	0	0	0
22	20	20	5	20	0	20	20
30	50	15	5	20	26,3	50	12,5
44	250	15	2,50	50	39,35	125	100
50	165	20	6,75	20	100	50	150
66	165	20	20	20	165	100	100
72	125	20	50	20	125	28	100

Tabela 4.7 – Dados da atividade de PG para cada ensaio e por tempo de fermentação

Tempo de fermentação (h)	Atividade PG (U/g)						
	Ensaio						
	1	2	3	4	5	6	7
7	8,65	0	0	0	0	0	0
22	11,35	10,20	0,80	14,85	12,20	4,25	10,90
30	13,90	8,20	2,80	17,65	18,25	13,55	12,30
44	19,25	13,55	2,05	17,05	19,60	19,70	18,00
50	16,70	2,17	6,45	15,05	17,95	15,40	20,00
66	20,90	9,75	8,10	14,70	18,55	18,70	20,35
72	19,45	10,65	13,60	15,15	18,00	16,35	18,50

4.3.1.1 Atividade pectinolítica (AP)

Na Tabela 4.8 são apresentados os modelos de regressão, os respectivos coeficientes de determinação (R^2) e o Teste F para os dados de atividade pectinolítica. Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Tabela 4.8 – Modelos empíricos decodificados para atividade pectinolítica (AP) nos diferentes tempos de fermentação analisados a 95% de confiança

Modelo empírico	R^2 (%)	Teste F
AP (22h) = 63,75 – 0,75 U* – 45,00 N* + 0,75 U*.N*	37,50	0,06
AP (30h) = 268,04 – 4,25 U* – 145,00 N* + 2,50 U*.N*	58,26	0,15
AP (44h) = 1536,25 – 25,88 U* – 812,50 N* + 14,13 U*.N*	90,89	1,08
AP (50h) = 949,92 – 15,16 U* – 474,75 N* + 7,91 U*.N*	65,72	0,21
AP (66h) = 918,04 – 14,50 U* – 435,00 N* + 7,25 U*.N*	60,83	0,17
AP (72h) = 573,11 – 9,00 U* – 225,00 N* + 3,75 U*.N*	52,47	0,12

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da qualidade do ajustamento de regressão à nuvem de pontos. Pode ser expresso em porcentagens, multiplicando o resultado obtido por 100. Quanto mais próximo de 100 estiver o valor de R^2 , melhor

terá sido o ajuste do modelo aos dados. O teste F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado. Sempre que esta relação for maior que 1 a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS NETO et al., 1995).

Em 44 horas de fermentação, o Teste F é maior que 1, e o modelo é estatisticamente significativo em relação aos dados experimentais. O valor do R^2 é igual a 90,89%. A análise da ANOVA Tabela 4.9 se restringe a este tempo.

Tabela 4.9 – Análise de variância para atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação a 95% de confiança

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	40029,69	3	13343,23	1,08
Resíduo	4010,78	3	1336,93	
Total	44040,47	6	-	
R^2 (%)	90,89	-	-	
Ftab	9,28			

G.L. – Grau de liberdade; S.Q. – Soma dos quadrados; Q.M. – Quadrado médio dos desvios

O diagrama de Pareto para a resposta AP está apresentado no APÊNDICE II – (Figura II.1). O diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes, considerando os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Para a atividade pectinolítica apenas o efeito da interação entre as variáveis de entrada foi significativo, ao nível de confiança estudado.

Na Figura 4.14 tem-se a construção da superfície de resposta, mostrando os efeitos das variáveis umidade inicial (U^*) e concentração da fonte de nitrogênio (N^*) sobre a resposta atividade pectinolítica (AP).

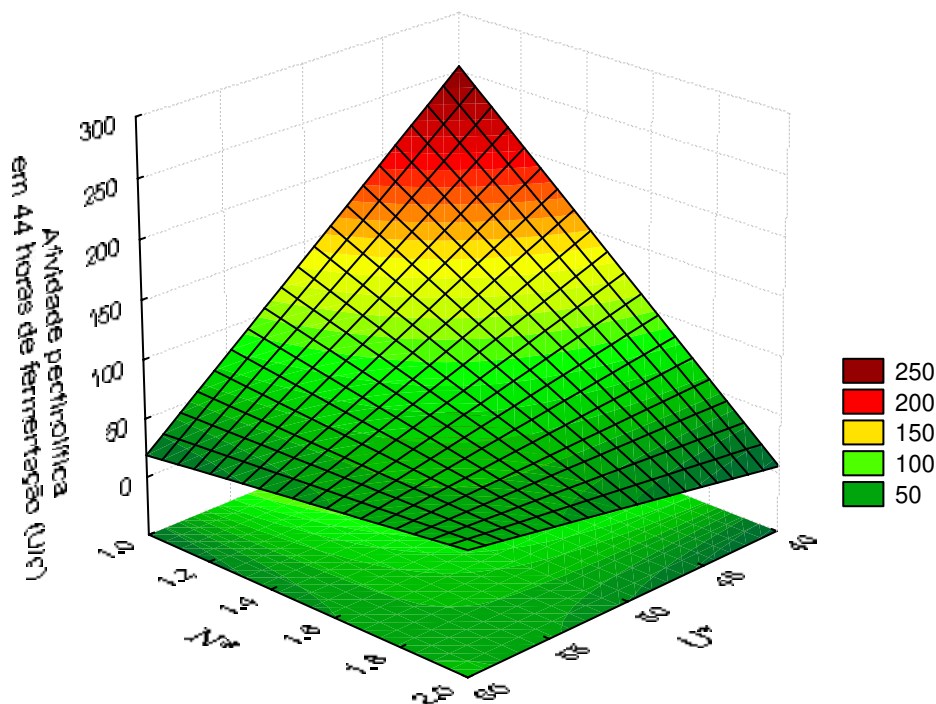


Figura 4.14 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação

A superfície de resposta indica que, dentro da faixa estudada para as variáveis independentes, a atividade enzimática é maior quando a umidade inicial e a concentração da fonte de nitrogênio no meio, são menores, alcançando o valor máximo de 253,75 U/g.

4.3.1.1 Atividade de poligacturonase (APG)

Para os dados da atividade de PG, a análise feita com um modelo de primeira ordem, mostrou que os coeficientes de determinação foram baixos e pelo teste F os modelos não foram estatisticamente significativos como pode ser observado no APÊNDICE II, na Tabela II.1, e por isso decidiu-se testar a importância da curvatura, para verificar se o modelo tem tendência a ser quadrático. Na Tabela 4.10, apresentam-se os modelos de ajuste com curvatura em termos das variáveis originais (não codificadas), os coeficientes de determinação e o teste F para atividade de PG nos

instantes de tempos analisados do processo. Os coeficientes dos modelos que tiveram efeitos significativos nas respostas, ao nível de 95% de confiança foram destacados em negrito.

Tabela 4.10 – Modelos empíricos decodificados considerando o efeito de curvatura para atividade de PG nos diferentes tempos de fermentação analisados a 95% de confiança

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
APG(22h) = 54,60 – 0,18 Curv. – 0,82 U* – 40,95 N* + 0,76 U*.N*	74,83	0,08
APG(30h) = 77,50 + 4,06 Curv. – 1,32 U* – 52,20 N* + 1,03 U*.N*	88,76	0,21
APG(44h) = 88,05 + 6,18 Curv. – 1,30 U* – 58,00 N* + 1,03 U*.N*	99,24	3,40
APG(50h) = 102,27 + 7,69 Curv. – 1,88 U* – 56,51 N* + 1,16 U*.N*	95,86	0,60
APG(66h) = 91,50 + 5,84 Curv. – 1,45 N* – 48,30 U* + 0,89 U*.N*	98,75	2,05
APG(72h) = 63,60 + 2,90 Curv. – 0,96 U* – 26,55 N* + 0,52 U*.N*	95,59	0,56

Curv. = Curvatura

Os coeficientes das equações dos modelos para as variáveis U* e N*, possuem sinal negativo, indicando que nos níveis mais baixos destas variáveis é onde se obtêm os maiores valores de atividade de PG. Para esta variável resposta será mostrada a análise em 44 e 66 horas de fermentação. Os modelos APG (44h) e APG (66h) apresentam R² igual a 99,24% e 98,75%, respectivamente. O Teste F nestes tempos mostram que os modelos são estatisticamente significativos. Nas Tabelas 4.11 e 4.12 são apresentadas as análises de variância para os tempos de 44 e 66 horas, respectivamente.

Tabela 4.11 – Análise de variância para atividade de PG em 44 horas de fermentação a 95% de confiança

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	238,55	4	59,64	3,4
Resíduo	1,82	2	0,91	
Total	240,37	6	-	
R ² (%)	99,24	-	-	
F _{tab}	19,25			

G.L. – Grau de liberdade; S.Q. – Soma dos quadrados; Q.M. – Quadrado médio dos desvios

Tabela 4.12 – Análise de variância para atividade de PG em 66 horas de fermentação a 95% de confiança

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	157,76	4	39,44	2,05
Resíduo	2,00	2	1,00	
Total	159,76	6	-	
R ² (%)	98,75	-	-	
F _{tab}	19,25			

G.L. – Grau de liberdade; S.Q. – Soma dos quadrados; Q.M. – Quadrado médio dos desvios

No gráfico de Pareto, para o caso de 44 horas, verifica-se que as variáveis U* e N* influenciam individualmente na resposta, como também exercem efeito significativo quando considera-se o efeito de interação entre as variáveis (APÊNDICE II – Figura II.2), e para o tempo de 66 horas, apenas a interação entre U* e N* teve efeito significativo (APÊNDICE II – Figura II.3).

Nas Figuras 4.15 e 4.16, estão ilustradas as superfícies de resposta para verificar a influência da umidade inicial e concentração de nitrogênio na atividade de PG. Pode-se observar que ao passar do nível -1 para +1, tem-se uma diminuição na atividade de PG, ou seja, maiores valores de atividades enzimáticas são alcançados quando trabalha-se com menores umidades e concentrações da fonte de nitrogênio. Provavelmente o substrato (resíduo do maracujá), já contém a quantidade de nitrogênio protéico necessária ao desenvolvimento do microrganismo.

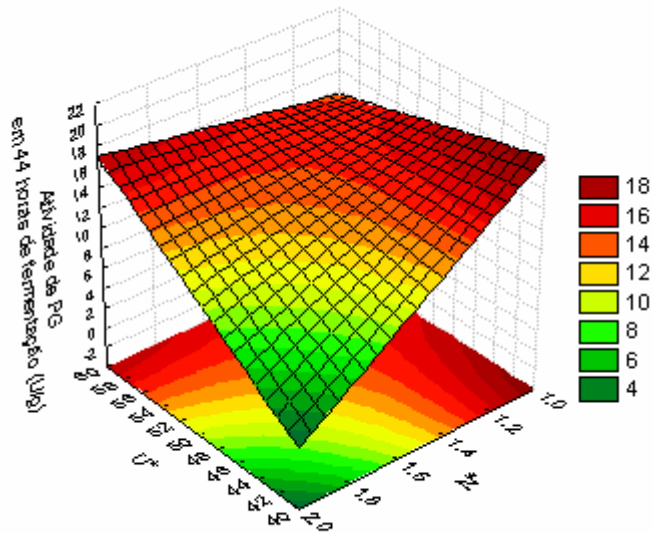


Figura 4.15 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação

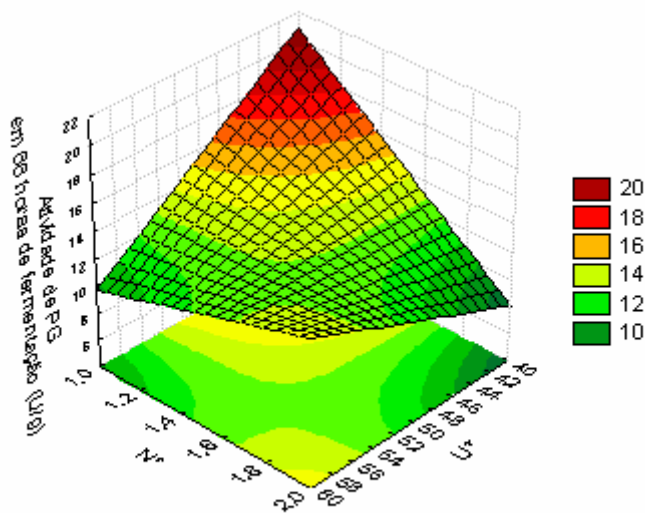


Figura 4.16 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade de PG em 66 horas de fermentação

4.3.2 Avaliação das respostas utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado

Usando o planejamento experimental também é possível fazer um estudo do efeito das variáveis de entrada sobre as respostas, observando-se o valor de atividade enzimática máxima obtido em cada ensaio.

Nas Tabelas 4.13 e 4.14 estão apresentados estes valores para cada ensaio realizado.

Tabela 4.13 – Dados de maior atividade de pectinases para cada experimento durante a cinética fermentativa do processo semi-sólido

Ensaio	Umidade inicial (%)	Concentração de nitrogênio (%)	Tempo de fermentação (h)	Atividade pectinolítica máxima (U/g)
1	40	1,0	44	250
2	60	1,0	22	20
3	40	2,0	72	50
4	60	2,0	44	50
5	50	1,5	66	165
6	50	1,5	44	125
7	50	1,5	50	150

Tabela 4.14 – Dados de maior atividade de poligalacturonase para cada experimento durante a cinética fermentativa do processo semi-sólido

Ensaio	Umidade inicial (%)	Concentração de nitrogênio (%)	Tempo de fermentação (h)	Atividade de PG máxima (U/g)
1	40	1,0	66	20,90
2	60	1,0	44	13,55
3	40	2,0	72	13,60
4	60	2,0	44	17,65
5	50	1,5	44	19,60
6	50	1,5	44	19,70
7	50	1,5	66	20,35

4.3.2.1 Avaliação da resposta AP utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado

Para a atividade pectinolítica, foram analisados o modelo sem o efeito da curvatura. No APÊNDICE II - Tabela II.2 e II.3, têm-se a análise do modelo ao nível de 95 e 90% de confiança, respectivamente. Pode-se observar pelo valor do Teste F que este não foi estatisticamente significativo. Realizando o teste de curvatura, (APÊNDICE II - Tabela II.4) o modelo obtido também não é estatisticamente significativo a 95% de confiança. Desta forma, baixando o nível de confiança para 90% o modelo tornou-se preditivo, com todos os efeitos significativos. A razão F calculado por F tabelado ficou acima de 4. O valor de R^2 foi de 97,38%, conforme pode ser visto na Tabela 4.15. Os termos do modelo significativo ao nível de 90% para a resposta, foram destacados em negrito.

Tabela 4.15 – Modelo empírico decodificado considerando o efeito da curvatura para atividade pectinolítica analisado ao nível de 90% de confiança

Modelo empírico	R^2 (%)	Teste F
AP = 1370 + 59,17 Curv. – 23,00 U* – 660 N* + 11,50 U*.N*	97,38	15,00

Curv. = Curvatura

A análise de variância para o modelo da atividade pectinolítica analisado a 90% de confiança está apresentada na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Análise de variância para atividade pectinolítica

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	39676,19	4	9919,05	15,00
Resíduo	1066,67	2	533,34	
Total	40742,86	6	-	
R^2 (%)	97,38	-	-	
F _{tab}	1,24			

G.L. – Grau de liberdade; S.Q. – Soma dos quadrados; Q.M. – Quadrado médio dos desvios

O gráfico de Pareto, mostrando os efeitos estatisticamente importantes, encontra-se no APÊNDICE II, Figura II.3.

A Figura 4.17 mostra a superfície de resposta para este caso. Observa-se que mesmo analisando os dados com base no maior valor de atividade enzimática para cada ensaio realizado, a umidade e concentração da fonte de nitrogênio devem ser menores no meio para que esta atividade seja máxima.

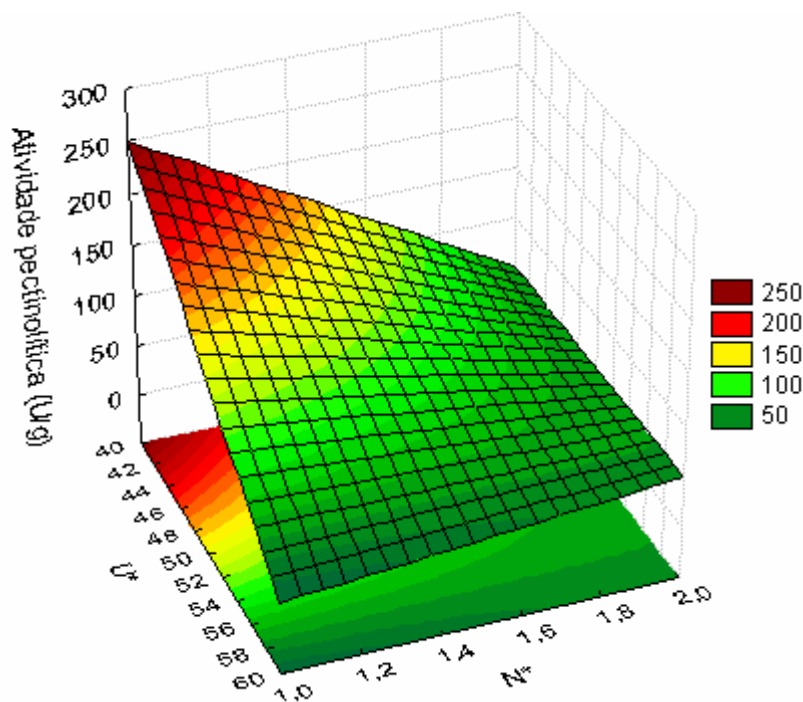


Figura 4.17 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na atividade pectinolítica

4.3.2.2 Avaliação da resposta APG utilizando os dados de maior atividade para cada ensaio realizado

Semelhante aos casos anteriores, na análise da resposta APG considerando os dados de maior valor para cada ensaio, o modelo de primeira ordem não ajustou-se adequadamente. No APÊNDICE II, Tabela II.5, encontra-se este modelo, assim como o coeficiente de determinação, ao nível de 90% de confiança. Desta forma, há evidências da existência dos termos quadráticos no modelo, pelo menos na região estudada e por isso decidiu-se testar o efeito de curvatura.

A Tabela 4.17, apresenta o modelo obtido para atividade de PG considerando o efeito de curvatura. Os termos do modelo significativos ao nível de 95% de confiança para a resposta, foram destacados em negrito.

Tabela 4.17 – Modelo empírico decodificado considerando o efeito da curvatura para atividade de PG

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
APG = 65,70 + 3,34 Curv. – 0,94 U* – 30,10 N* + 0,570 U*.N*	99,85	16,80

O gráfico de Pareto desta análise está no APÊNDICE II, Figura II.4. Assim, pode-se verificar que a umidade inicial e concentração de nitrogênio, bem como a interação entre essas duas variáveis influenciaram nas respostas. A Tabela 4.18 apresenta o resultado da análise da variância (ANOVA) do modelo obtido para a atividade de PG. Vê-se que a razão F_{cal}/F_{tab} é bem maior que 4, constatando que o modelo é preditivo. Pode-se dizer que esse modelo explica 99,85% da variância, conforme valor de R², ao nível de 95% de confiança.

Tabela 4.18 – Análise de variância para atividade de PG

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Teste F
Regressão	56,91	4	14,23	16,80
Resíduo	0,087	2	0,044	
Total	57,00	6	-	
R ² (%)	99,85	-	-	
F _{tab}	19,25			

G.L. – Grau de liberdade; S.Q. – Soma dos quadrados; Q.M. – Quadrado médio dos desvios

A Figura 4.18 apresenta a superfície de resposta mostrando a influência das variáveis: umidade e concentração de nitrogênio sobre a atividade de PG.

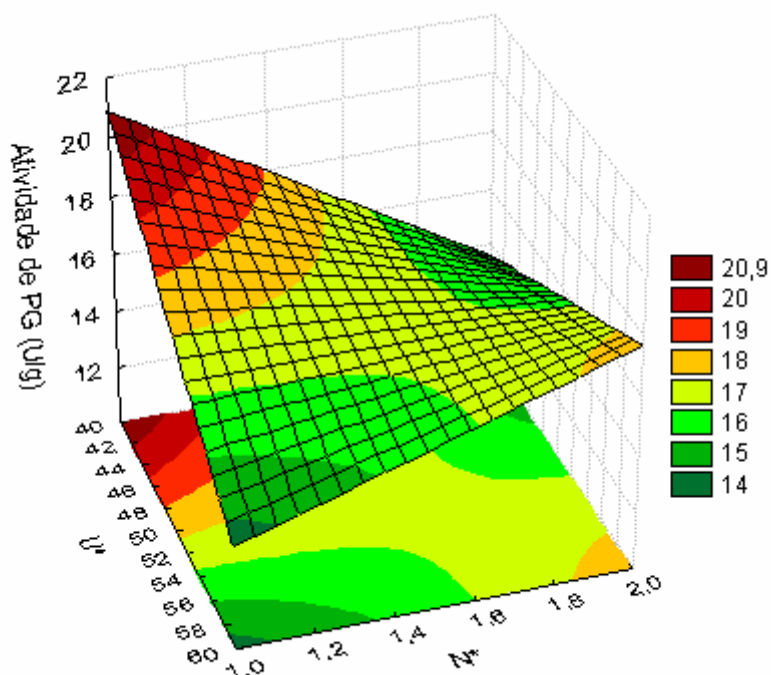


Figura 4.18 – Influência da umidade inicial (%) e concentração de nitrogênio (%) na produção de PG

Pode-se observar que a superfície apresenta a mesma tendência da análise feita por tempo de fermentação. As melhores condições para obtenção das enzimas foram observadas nos níveis mais baixos das variáveis de entrada, assim a umidade inicial do meio e a concentração da fonte de nitrogênio devem ser menores para aumentar a atividade PG.

4.4 Rendimento do substrato para obtenção da atividade de PG máxima durante o processo fermentativo

Na etapa inicial do trabalho foi realizada a pesagem do resíduo após ter sido seco e moído. Conforme Tabela 4.1, sabe-se que 10,5 kg de casca e albedo de maracujá *in natura*, geraram 1,155 kg de resíduo seco e moído. Dessa forma, pode-se determinar o rendimento deste substrato para obtenção da atividade máxima de PG.

Com base no que já foi discutido na sessão 4.3 do planejamento experimental, foi possível observar que nas condições de menor umidade inicial (40%) e menor concentração da fonte de nitrogênio (1%) no meio, consegue-se uma maior atividade de PG, tanto na análise feita por tempo de fermentação quanto na avaliação utilizando os

dados de atividade máxima de cada ensaio. Assim, utilizando-se 1,8 kg de resíduo úmido, isto é 1,155 kg de resíduo seco mais a quantidade de água necessária para chegar a 40% de umidade, conforme Equação (3.7), é possível obter aproximadamente 180 erlenmeyers contendo a PG (enzima bruta) com 20,9 unidades de atividade cada um, já que no processo fermentativo utilizou-se 10 g de resíduo úmido. Então para obter estes 180 erlenmeyers com 10 g de resíduo úmido foram necessários 17,1 kg de maracujá, o que correspondeu a 141 frutos.

4.5 Estudo da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH da poligalacturonase produzida

Os testes de estabilidade da PG foram realizados utilizando-se o extrato enzimático bruto obtido por cultivo do fungo nas condições de 40% de umidade inicial e 1,0% de concentração da fonte de nitrogênio em 44 horas de fermentação sem que houvesse nenhum tratamento físico que pudesse melhorar a atividade da enzima.

A poligalacturonase produzida apresentou boa estabilidade térmica até a temperatura de 50 °C, conforme pode ser observado na Figura 4.19, apresentando 75% da atividade máxima determinada nas condições padrões (pH 4,5 e temperatura de 35 °C). Quando exposta a 60 °C, manteve 31% dessa atividade e chegando a 70 e 90 °C, não foi mais detectada.

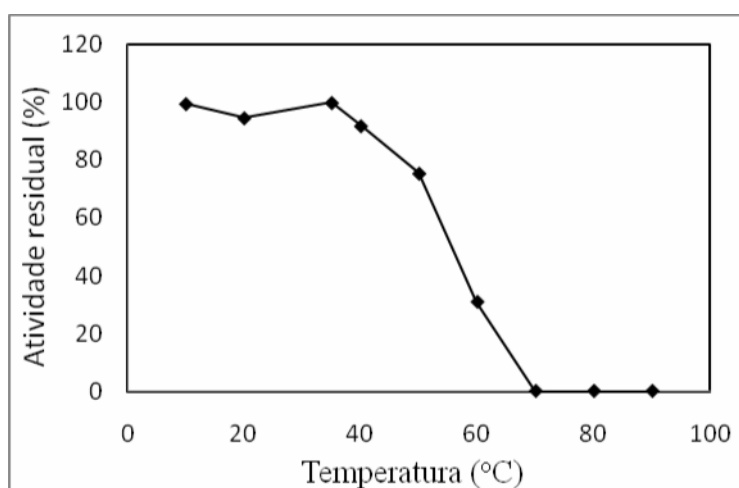


Figura 4.19 – Estabilidade da poligalacturonase produzida por FSS frente às variações de temperatura

Esta enzima foi instável em pH 2,5 exibindo 22% de sua atividade máxima. No entanto, apresentou boa tolerância a valores de pH entre 3,5 e 5,5 (Figura 4.20), e considerando que o pH natural de sucos é ácido, esta enzima poderá ser utilizada nos processos industriais de extração e clarificação destes sem perda considerável de sua estabilidade. E a partir do pH 6,5, não observou-se atividade da poligalacturonase. Estes resultados, se aproximam dos encontrados por ZHENG & SHETTY (2000), na qual a PG produzida apresentou boa termoestabilidade em temperaturas até 50 °C, porém estes autores conseguiram uma enzima estável ao pH 6,5 e apenas para valores de pH elevados (acima de 9,0) é que esta tornou-se muito instável.

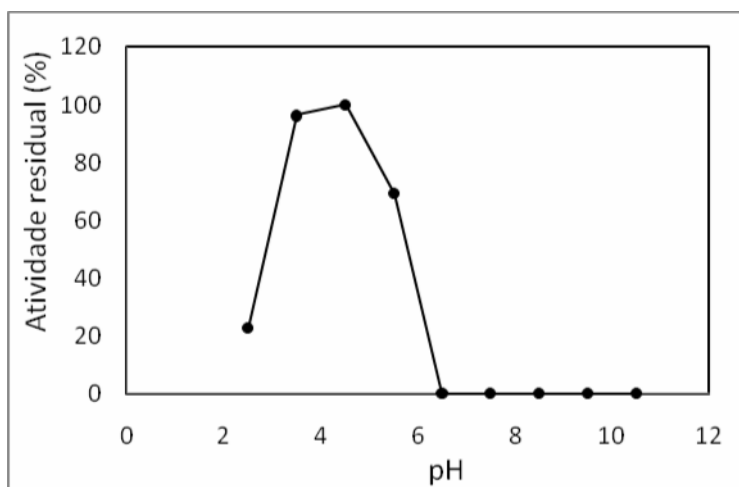


Figura 4.20 – Estabilidade da poligalacturonase produzida por FSS diante às variações de pH

5. Conclusões

- A caracterização do resíduo seco mostrou que este substrato pode ser considerado viável para produção de pectinases, já que este apresentou condições favoráveis a adaptação do fungo e níveis de pectina e açúcar, propícios para produção destas enzimas.
- O modelo de GAB ajustou-se adequadamente às isotermas. De acordo com a classificação de BET, as curvas foram do tipo III, e conforme BLAHOVEC (2004) classificaram-se como sendo do tipo II.
- O comportamento dos testes cinéticos demonstrou que o microrganismo pode hidrolisar carboidratos de outras fontes acumulando açúcares redutores no meio, tendo desta forma, uma fonte de energia disponível para produção das enzimas pectinolíticas. A concentração da fonte de nitrogênio a 2,0% pode levar o microrganismo a passar mais tempo na fase de adaptação dificultando a absorção dos nutrientes pelas hifas vegetativas.
- A utilização da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta permitiram observar que em menores conteúdos de umidade e concentração da fonte de nitrogênio obtêm-se os maiores valores de atividade das enzimas pectinolíticas, assim como da poligalacturonase. A máxima produção de pectinases foi obtida em 40% de umidade e 1,0% da concentração da fonte de nitrogênio, alcançando 250,0 U/g de meio fermentado para a atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação e 20,9 U/g para atividade poligalacturonásica no tempo de 66 horas de processo. Com o resíduo seco obtido neste trabalho, é possível conseguir aproximadamente 1,8 kg de meio fermentado com atividade poligalacturonásica (enzima bruta) de aproximadamente 21 U.
- Quanto ao estudo de estabilidade da poligalacturonase produzida no extrato enzimático bruto, esta mostrou boa estabilidade até 50 °C, apresentando 75% da atividade máxima obtida nas condições padrões de pH e temperatura. Em temperaturas acima de 70 °C não pode ser detectada. Com relação à estabilidade diante às variações de pH, a enzima apresentou boa tolerância em valores de pH entre 3,5 e 5,5. A partir de

maiores valores de pH (acime de 6,5) não foi observada atividade poligalacturonásica.

6. Referências Bibliográficas

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Solo - Análise Granulométrica NBR-7181**, 1984.

ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando a produção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ____, 2007. CD.

AFONSO JÚNIOR, P. C. A.; CORRÊA, P. C.; SILVA, F. S.; RIBEIRO, D. M. Atividade de água, crescimento microbiológico e perda de matéria seca dos grãos de café (*coffea arabica* L.) em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.1, p.17-24, 2003.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n.1, p. 11-20, 2007.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p. 21- 28, 1998.

ALVES, R. M. V. Quem tem medo de atividade de água? In: **Atividade de água em alimentos**. JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p. 13.1-13.8, 1997.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 480 p.

BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. **Journal Food Engineering**, v.65, n.4, p. 489–495, 2004.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.42, n.1, p. 98-101, 2007.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 3, 40-44, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Editora MS, 2005, 1017 p.

BRAVO, C. E. C; CARVALHO, E. P; SCHWAN, R. F.; GOMEZ, R. J. H. C., PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciências Agrotécnicas**, v.24 (Edição Especial), p.137-152, 2000.

BRUNAUER, S.; EMMETT, T. H.; TELLER, F. W. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemistry Society**, v.60, n.1, p. 309-319, 1938.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Stastística**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003, 259 p.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. 1997. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo

(*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtida por secagem. **Boletim do CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. 2004. 163f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 1993. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8, **Process Biochemistry**, v.35, n.3, p. 255 – 261, 2000.

DANIEL, M.R.; TRINDADE, V. Influência do pH na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais...** Maringá: ____, 1996. CD.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; SCANDOLARA C.; COSTA, J. A. V.; SILVEIRA, M. M Estudo comparativo da produção de pectinases por fermentação semi-sólida com diferentes fungos filamentosos. In: VI SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1999, Maringá. **Anais...** Maringá: ____, 1999. CD.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; Fermentação em estado semi-sólido. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, cap. 13, p. 250-254, 2001.

DEMIATE, I. M.; WOSIAKYI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative studies between colorimetric and titration techniques. **Exact and Soil Sciences, Agrarian and S. Engineering**, v.8, n.1, p. 65-78, 2002.

EMBRAPA AGROINDUSTRIAL TROPICAL. Fortaleza – Ceará.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. **A cultura do maracujá**. Brasília: Coleção Plantar, 107 p, 2004.

FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, n.4, p. 223-227, 2003.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. **Anais...** Recife: ____, 2005. CD.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 136 – 145, 2007.

HENNIES, P. T. **Produção de pectinases de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. 1996. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. An alternative to the Guggenheim, Anderson and De Boer model for the mathematical description of moisture sorption isotherms of foods. **Food Research International**, v. 28, n. 3, p. 317-321, 1995.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002. Disponível na internet. <http://www.ibge.gov.br/>, acessado em 25 maio de 2007.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, p. 2931-2944, 2005.

LEITÃO, M. F. F. Atividade de água e alterações microbiológicas dos alimentos. In: **Atividade de água em alimentos**. JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p. 13.1-13.8, 1997.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A.S. LABUZA, T.P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. **Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie**, v. 18, p. 111-117, 1985.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v.77, n.3, p. 215-227, 2001.

KEEY, R.B. **Drying of loose and particulate materials**. New York: Hemisphere, 1991, 57 p.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. 2006. 65f. Dissertação (Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SILVA, R.; GOMES, E. Utilização de resíduos agroindustriais em Fermentação em Estado Sólido (FES) para avaliar a produção de Poligalacturonase (PG) pelo fungo termofílico *Rhizomucor* sp N31. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ____, 2007. CD.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; MARTIN, N.; MONTEIRO, A. C.; LEITE, R. S.; SILVAR., R.; GOMES, E. Produção e caracterização de uma poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. **Anais...** Recife: ____, 2005. CD.

MATSUURA, F. C. A. U. **Estudo do albedo do maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais**. 2005. 138f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MORAES, R. O. Bioprodutos para Agricultura Orgânica. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ____, 2007. CD.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, n.1, p. 57-67, 2003.

NP: Normas Portuguesas. **Inertes para argamassas e betões. Análise granulométrica NP-1379**. Edição 1, 1976. Disponível na internet. <http://portal.doc.ua.pt/Bibonline/normas/NP.pdf>. Arquivo capturado em 20 de janeiro de 2007.

OLIVEIRA, M. M. **Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal**. 2007. 126f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N., RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.3, p. 259-262, 2002.

OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. Nutritive values and utility of passion fruit by products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 54-57, 1958.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ____, 2003. CD.

PANDEY, A. Recent process developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n.2, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.8, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAULA, B.; MORAES, I. V. M; CASTILHO, C. C.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático. **Boletim CEPPA**, v. 22, n.2, p. 311-324, 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia I**. São Paulo: Mc Graw – Hill, 1980, v. 1,

PENA, R.S.; RIBEIRO, C.C; GRANDI, J. G. Aplicação de modelos matemáticos bi e triparmétricos na predição das isotermas de adsorção de umidade de guaraná (*Paullinia cupuna*) em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p. 8-11, 2000.

PEREIRA, M. S. A. **Purificação de uma endo-poligalacturonase, produzida por, *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistemas de duas fases aquosas.** 2005. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Portugal.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado técnico EMBRAPA**, 2005. Disponível na internet. www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf. Arquivo capturado em 16 outubro de 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H., SANTOS, S. F. M., MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, p. 17-20, 2006.

RANGANA, S., **Manual of analysis of fruit and vegetable products.** New Delhi: Tata McGraw- Hill, Publishing Company Limited, p. 94-95, 1979.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; BOZA, A. P. O.; TEORDORO, J.; MIAYOKA, M.; SOCCOL, C. R. Optimization of Citric Acid Production by Solid State Fermentation Using Citric Pulp as Substrate. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ____, 2007. CD.

RODRIGUES FILHO, J. A. R.; CAMARÃO, A. P. **Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina**, 2005. [on line] Disponível na internet. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/sconcentrada.htm>. Arquivo capturado em 07 de janeiro de 2008.

SANTOS, S. F. M.; **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, capítulo 1, p. 85-95, 1996

SILVA, J. D. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. São Paulo: Editora UFV, 1998, 166 p.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa) *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 254-258, 2002.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.

TERZI, S. C.; CARVALHO, C. V. P.; OLIVEIRA, A. C. P.; COURI, S. Influência da variação da concentração de inoculo do *Aspergillus niger* 3T5B8 e da umidade do meio de fermentação sobre a produção de enzima poligalacturonase. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ____, 2003. CD.

TIMMERMANN, E.O. Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 220, n. 1-3, p. 235-260, 2003.

TIMMERMANN, E. O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H. A. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? **Journal of Food Engineering**, v. 48, n.1, p.19 -31, 2001.

TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais...** Maringá: ____, 1996. CD.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais**. 2003. 113f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações Industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.388-394, 2007.

VIANA, F.; M.; P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J.C. Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle **Comunicado técnico EMBRAPA**, 2003. [on line] Disponível na internet. http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/ComTec/cot_86.pdf. Arquivo capturado em 09 de agosto de 2007.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 323-329, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Valores experimentais e teóricos, e erro relativo para a
umidade de equilíbrio, nas temperaturas estudadas

Tabela I.1 Dados experimentais e teóricos, e erro relativo para a umidade de calculados para o modelo de GAB nas temperaturas de 25 e 30°C

Umidade de equilíbrio (b.s.) Teórico Experimental			Erro relativo	Umidade de equilíbrio (b.s.) Teórico Experimental			Erro relativo
25°C				30°C			
0,097	0,121	0,198	0,109	0,121	0,099		
0,141	0,138	-0,022	0,147	0,138	-0,065		
0,200	0,191	-0,047	0,199	0,191	-0,042		
0,262	0,263	0,004	0,261	0,263	0,008		
0,385	0,352	-0,094	0,355	0,352	-0,009		
0,464	0,446	-0,040	0,437	0,446	0,020		
0,523	0,562	0,069	0,556	0,562	0,011		
0,627	0,644	0,026	0,650	0,644	-0,009		
0,803	0,790	-0,016	--	--	--		

Tabela I.2 - Dados experimentais e teóricos, e erro relativo para a umidade de calculados para o modelo de GAB nas temperaturas de 35 e 40°C

Umidade de equilíbrio (b.s.) Teórico Experimental			Erro relativo	Umidade de equilíbrio (b.s.) Teórico Experimental			Erro relativo
35°C				40°C			
0,111	0,124	0,105	0,108	0,124	0,129		
0,145	0,138	-0,051	0,146	0,138	-0,058		
0,178	0,164	-0,085	0,179	0,164	-0,091		
0,226	0,225	-0,004	0,228	0,225	-0,013		
0,339	0,337	-0,009	0,339	0,337	-0,006		
0,441	0,459	0,039	0,439	0,459	0,044		
0,562	0,554	-0,014	0,563	0,554	-0,016		

APÊNDICE II

Dados complementares na análise do planejamento
experimental

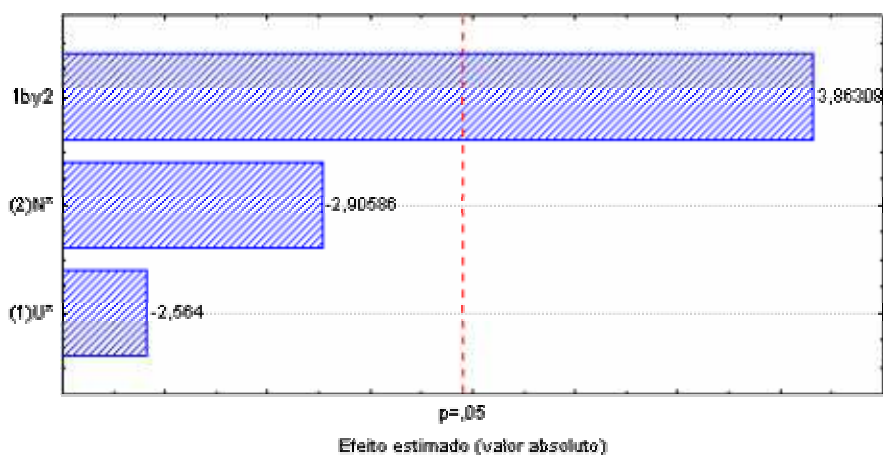


Figura II.1 – Gráfico de Pareto para atividade pectinolítica em 44 horas de fermentação analisado ao nível de 95% de confiança

Tabela II.1 – Modelo empírico decodificado para atividade de PG nos diferentes tempos de fermentação analisados a 95% de confiança

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
APG (22h) = 54,52 – 0,82 U* – 40,95 N* + 0,76 U*.N*	74,79	0,32
APG (30h) = 79,24 – 1,32 U* – 52,20 N* + 1,03 U*.N*	72,61	0,29
APG (44h) = 90,70 – 1,30U* – 58,00 N* + 1,03 U*.N*	72,05	0,28
APG (50h) = 105,57 – 1,88U* – 56,51 N* + 1,16 U*.N*	56,29	0,14
APG (66h) = 94,00 – 1,45U* – 48,30 N* + 0,89 U*.N*	62,19	0,18
APG (72h) = 64,84 – 0,96U* – 26,55 N* + 0,52 U*.N*	70,38	0,26

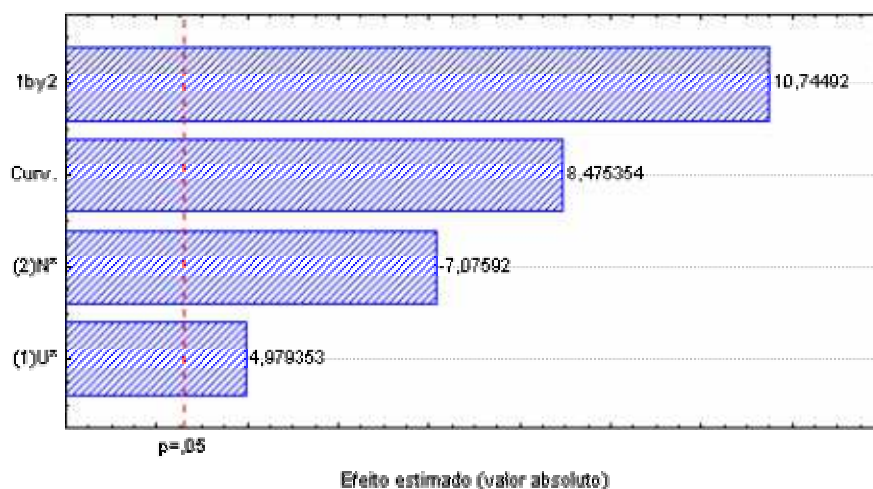


Figura II.2 – Gráfico de Pareto para atividade de PG em 44 horas de fermentação analisado ao nível de 95% de confiança considerando o teste de curvatura

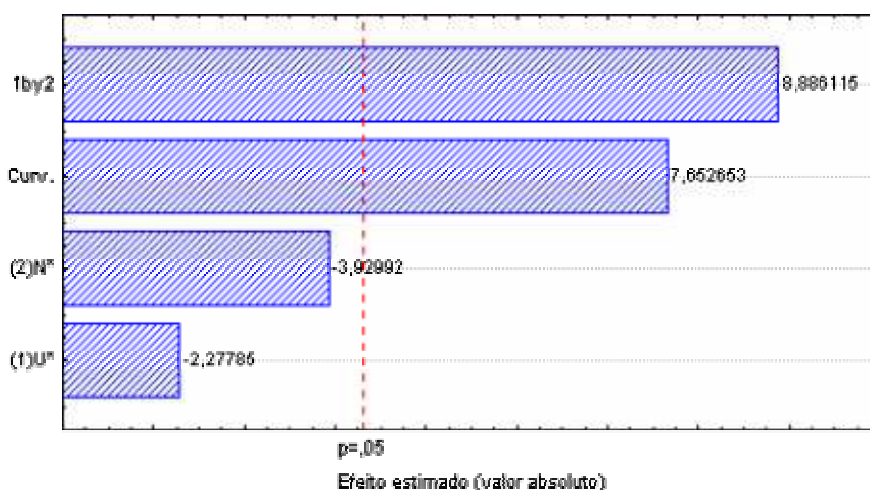


Figura II.3 – Gráfico de Pareto para atividade de PG em 66 horas de fermentação analisado ao nível de 95% de confiança considerando o teste de curvatura

Análise dos dados com o maior valor de atividade enzimática para cada ensaio durante as 72 horas de fermentação

Tabela II.2 – Modelo empírico decodificado, coeficiente de determinação e Teste F para atividade pectinolítica a 95% de confiança

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
AP = 1395,36 – 23 U* – 660 N* + 11,5 U*.N*	82,65	0,51

Tabela II.3 – Modelo empírico decodificado, coeficiente de determinação e Teste F para atividade pectinolítica a 90% de confiança

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
AP = 1395,36 – 23 U* – 660 N* + 11,5 U*.N*	82,65	0,88

Tabela II.4 – Modelo empírico decodificado, coeficiente de determinação e Teste F para atividade pectinolítica a 95% de confiança considerando o efeito de curvatura

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
AP = 1370 + 59,17Curv. – 23 U* – 660 N* + 11,5 U*.N*	97,38	0,97

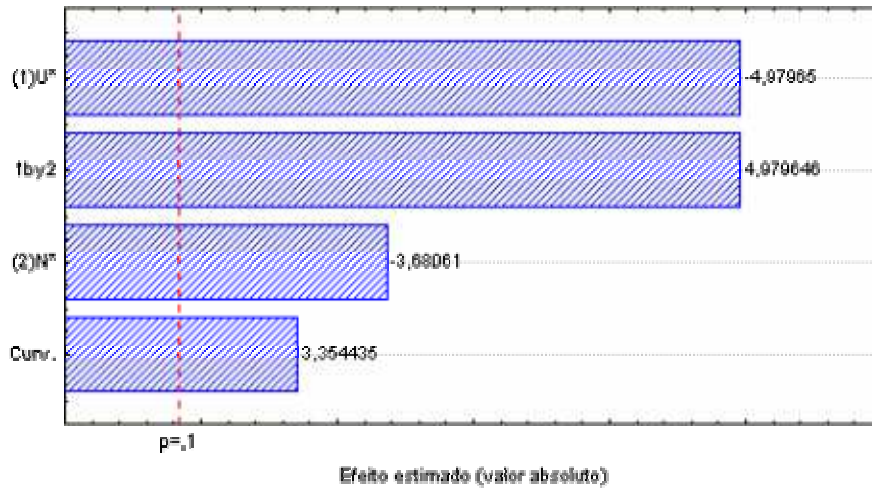


Figura II.4 – Gráfico de Pareto para atividade pectinolítica ao nível de 90% de confiança

Tabela II.5 – Modelo empírico decodificado, coeficiente de determinação e Teste F para atividade de PG a 90% de confiança

Modelo empírico	R ² (%)	Teste F
APG = 67,13 - 0,94 U* - 30,10 N* + 0,57	66,27	0,36

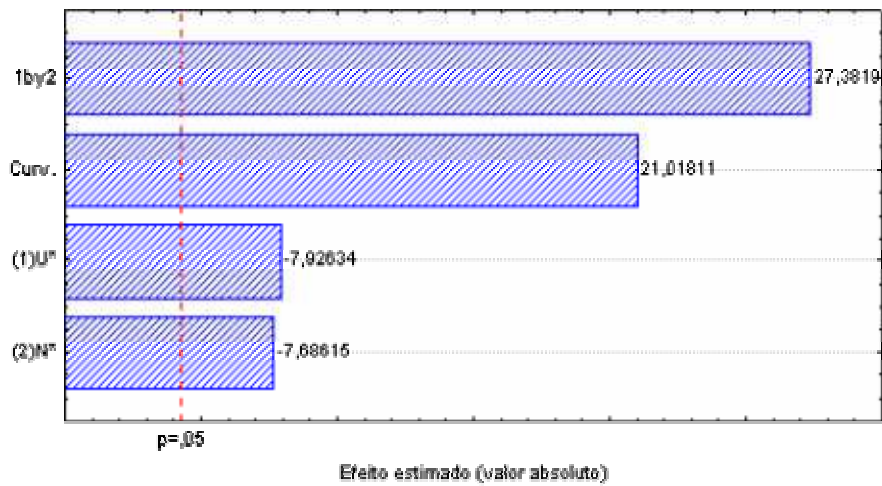


Figura II.5 – Gráfico de Pareto para atividade de PG ao nível de 95% de confiança